

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

IMPACT ANTI-INFLAMMATOIRE DE LA LUTÉOLINE SUR L'EXPRESSION DE LA  
CYCLOOXYGENASE-2 INDUITE PAR L'INTERLEUKINE-1 DANS LES  
GLIOBLASTOMES

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR  
PAULA LIANA MOLDOVAN

OCTOBRE 2014

## UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

Service des bibliothèques

### Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522-Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que « conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire. »

## REMERCIEMENTS

Je me retrouve aujourd'hui à la fin de ma maîtrise, une des étapes les plus marquantes de mon parcours académique. Je souhaite adresser mes remerciements les plus chaleureux et sincères aux personnes qui m'ont soutenue tout au long de ce long parcours et à celles qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire.

Je tiens à remercier le Dr Borhane Annabi, qui, en tant que directeur de recherche, m'a ouvert les portes de son laboratoire, m'a accueillie au sein de son équipe de recherche tout en m'offrant le soutien et les outils nécessaires pour laisser mon empreinte sur ce vaste domaine de la science.

J'aimerais aussi remercier ma superviseuse, la Dre Sylvie Lamy, pour m'avoir confiée ce projet de recherche et pour son support tout au long de ma maîtrise.

J'exprime ma gratitude à tous mes collègues de laboratoire : Arwa Ben Saad Lounis, Rima Chokor, Amélie Vézina, Amira Ouanouki, Hana Benenemissi, Alain Zgheib, Michel Desjarlais et Jonathan Pratt pour leur aide et leur contribution à une belle ambiance de travail.

Mes remerciements s'adressent également à mes parents et à ma sœur, pour leurs encouragements, pour m'avoir aidée à traverser les moments difficiles, leur patience extraordinaire et pour avoir tout fait dans leurs pouvoirs pour me voir réussir.

Je n'oublie pas mon copain et mes amis, ma deuxième famille, pour les longues heures passées avec moi pour m'aider et m'offrir du réconfort.

Enfin, j'adresse des remerciements à la Chaire en Prévention et Traitement du Cancer pour son support financier.

Merci à tous et à toutes.

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES .....	vii
RÉSUMÉ .....	xi
CHAPITRE I	
INTRODUCTION .....	1
1.1 Le cancer .....	1
1.1.1 Généralités .....	1
1.1.2 Statistiques.....	3
1.1.3 Glioblastomes .....	3
1.2 L'inflammation et le cancer .....	4
1.2.1 Généralités.....	4
1.2.2 Cytokine pro-inflammatoire: interleukine-1 (IL-1).....	7
1.2.3 Les récepteurs d'interleukine .....	10
1.2.3.1 Les récepteurs d'interleukine I.....	10
1.2.3.2 Les récepteurs d'interleukine II .....	10
1.2.3.3 L'antagoniste du récepteur d'interleukine-1 (IL-1 Ra).....	11
1.2.4 Cyclooxygénases .....	12
1.2.5 Le facteur nucléaire kappaB (NF-kB) .....	15
1.3 Les voies de signalisation intracellulaires impliquées dans le cancer.....	18
1.3.1 Les MAP kinases.....	18
1.3.1.1 La voie ERK.....	19
1.3.1.2 La voie JNK .....	21
1.3.1.3 La voie p38.....	23
1.3.2 La voie PI3K/AKT .....	24
1.3.3 Mécanismes cellulaires.....	25
1.3.3.1 L'apoptose .....	25
1.3.3.2 La caspase 3 .....	28
1.3.3.3 La survivine.....	29



1.3.3.4 GRP78 .....	29
1.4 Alimentation vs cancer .....	30
1.4.1 La lutéoline .....	32
CHAPITRE II	
PROJET DE RECHERCHE .....	35
2.1 Problématique .....	35
2.2 Hypothèses de travail .....	36
2.3 Objectifs de recherche .....	36
CHAPITRE III	
INVOLVEMENT OF NUCLEAR FACTOR-kB IN THE BIPHASIC EFFECTS OF LUTEOLIN ON CYCLOOXYGENASE-2 INDUCTION BY INTERLEUKIN-1 $\beta$ IN GLIOBLASTOMA CELLS .....	37
3.1 Abstract .....	39
3.2 Background .....	40
3.3 Results .....	42
3.4 Discussion .....	46
3.5 Materials and methods .....	49
3.6 Abbreviations .....	54
3.7 Acknowledgements .....	54
3.8 Figures .....	55
CHAPITRE IV	
4.1 Discussion .....	66
4.2 Conclusions et perspectives .....	74
RÉFÉRENCES .....	76

## LISTE DES FIGURES

Figures	Page
1.1. Processus de développement des cancers .....	2
1.2. Lien entre l'inflammation et le cancer .....	6
1.3. La synthèse, la maturation et la localisation cellulaire de l'IL-1 $\alpha$ et de l'IL-1 $\beta$ . ....	8
1.4. Régulation de l'activité de l'IL-1 par les deux formes membranaires et solubles des récepteurs de l'IL-1 .....	11
1.5. Biosynthèse des prostanoides.....	13
1.6. La voie de signalisation classique de NF-kB .....	17
1.7. Représentation schématique des voies de signalisation des MAPKs .....	19
1.8. Les voies extrinsèques et intrinsèques de l'apoptose.....	27
1.9. La structure moléculaire de la lutéoline.....	33
4.10. La modulation des voies de signalisation par la lutéoline .....	76
Figures de l'article	
3.1. Effect of luteolin on IL-1 $\beta$ -induced COX-2 gene and protein expression in human glioblastoma cells.....	55
3.2. Luteolin inhibits IL-1 $\beta$ -induced downstream signaling events in human glioblastoma cells.....	57
3.3. Luteolin modulates IL-1 $\beta$ -induced apoptotic and survival signaling pathways in human glioblastoma cells.....	59
3.4. IL-1 receptor antagonist and IL-1 receptor gene silencing affect IL-1 $\beta$ /luteolin-induced COX-2 gene and protein expression.....	61
3.5. NF-kB p65, but not NF-kB p50, gene silencing reverses the effect of luteolin on IL-1 $\beta$ -mediated induction of COX-2 expression.....	63
3.6. Effect of luteolin on IL-1 $\beta$ translocation to the nucleus.....	65

## LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADN	Acide désoxyribonucléique
Akt	Protéine kinase B
AIF	Facteur inducteur d'apoptose
AP-1	Protéine activatrice 1
Apaf1	<i>Apoptotic protease-activating factor-1</i>
ASK-1	<i>Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1</i>
ATP	Adénosine triphosphate
BAD	Antagoniste de mort cellulaire Bcl2
Bak	<i>Bcl2 antagonist killer</i>
Bax	<i>Bcl2 associated x protein/Bcl2 antagonist killer</i>
Bcl-2	<i>B cell leukemia 2 protein</i>
BHE	Barrière hémato-encéphalique
Bid	<i>BH3-interacting-domain death agonist</i>
tBid	<i>Truncated BH3-interacting-domain death agonist</i>
Bim	<i>Bcl2 interacting mediator of cell death</i>
CAD	<i>Caspase-activated deoxyribonuclease</i>
CISD	<i>CDGSH iron-sulfur domain-containing protein</i>
COX	Cyclooxygénase
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
Cyt-c	Cytochrome c
DHA	Acide docosahexaénoïque
Diablo	<i>Direct IAP-binding protein with low pI</i>
DISC	Complexe d'induction de la signalisation de mort cellulaire
DLK	<i>Death-associated protein kinase-like kinase</i>
Dwm	Dépolarisation de la membrane
EGF	Facteur de croissance épidermique
EGFR	Récepteurs aux facteurs de croissance épidermique
EMT	Transition épithélio-mésenchymateuse
EndoG	Endonucléase G

EndoG	Endonucléase G
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FADD	Fas-associé au domaine de la mort
FGF	Facteur de croissance de fibroblastes
Fls	<i>Fibroblast-like synoviocyte</i>
Flk	<i>Fetal liver kinase</i>
Fos	<i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>
Foxo	<i>Forkhead box o proteine</i>
GATA1	<i>GXlobin transcription factor 1</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
GRP78	Protéine régulée par le glucose 78
GTPases	Guanosine triphosphatases
HCC	Carcinome hépatocellulaire
HSP	Protéines de choc thermique
IAP	Protéine inhibitrice d'apoptose
IC50	Concentration inhibitrice médiane
ICAM-1	Molécules intracellulaires d'adhésion cellulaire 1
icIL-1Ra1	Antagoniste intracellulaire du récepteur d'interleukine-1
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IkB	Protéine inhibitrice kappa B
IKK	Kinase d'IkB
IL	Interleukine
IL-1R1	Récepteur d'interleukine-1 de type 1
IL-1RII	Récepteur d'interleukine-1 de tupe 2
IL-1RAcP	Protéine accessoire du récepteur d'interleukine-1
IL-1 Ra	Antagoniste du récepteur d'interleukine-1
IRAK	Kinase associée au récepteur d'interleukine-1
JNK	C-Jun kinases N-terminal
kDa	kilo Dalton
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MAPKK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>

MAPKKK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase</i>
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase ERK kinase</i>
MEKK	<i>Mitogen-activated protein kinase ERK kinase kinase</i>
Mcl-1	<i>Myeloid cell leukemia 1</i>
MCP1	<i>Méthyl-accepting chimiotaxis protein 1</i>
MIP	<i>Macrophage inflammatory proteins</i>
MKK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MLK	<i>Mixed lineage kinase</i>
MMP	<i>Métalloprotéase matricielle</i>
Mos	<i>v-mos Moloney murine sarcoma viral oncogene homolog</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene (88)</i>
NEMO	<i>Modificateur essentiel de Nf-kB</i>
NF-kB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NLR	<i>Sequence nucléaire de localisation</i>
iNOS	<i>Synthase inductible de l'oxyde nitrique</i>
Omi/HtrA2	<i>High temperature requirement protein A2</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide-3 kinase</i>
PIP2	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate</i>
PIP3	<i>Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate</i>
P38	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
P53	<i>Protéine suppresseur de tumeur</i>
P73	<i>p53-like transcription factor</i>
PKD	<i>Phosphoinositide-dependent kinase</i>
PDGF	<i>Facteur de croissance dérivé des plaquettes</i>
PDGFR	<i>Recepteurs des facteurs de croissance dérivés des plaquettes</i>
PG	<i>Prostaglandine</i>
PKB	<i>Protéine kinase B</i>
Pro	<i>Proline</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensine homologue</i>
Rac	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
Ras	<i>Rat sarcoma proteins</i>

RHD	<i>Rel homology domain</i>
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RTK	Récepteurs tyrosine kinase
sIL-1Ra	<i>Secretory interleukin-1 receptor antagonist</i>
SAPK	<i>Stress-activated protein kinase</i>
SiRNA	Petit ARN interférent
Smac	<i>Second mitochondria-derived activator of caspases</i>
STAT	Transducteurs de signal et des activateurs de transcription
STAT3	Transducteurs de signal et des activateurs de transcription 3
TAD	Domaine de transactivation
TAK	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math>-activated protein kinase</i>
Thr	Thréonine
TIR	<i>Toll-IL-1 receptor</i>
TLR	<i>Toll-like</i> récepteurs
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TNFR	Récepteur de facteur de nécrose tumorale
Tpl2	Locus de progression tumorale 2
TRADD	Récepteur de facteur de nécrose tumorale associé au domaine de la mort
TRAF6	Facteur 6 associé au récepteur du facteur de nécrose tumorale
TX	Thromboxane
Tyr	Tyrosine
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGFR	Recepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VCAM-1	Molécules vasculaires d'adhésion cellulaire 1



## RÉSUMÉ

Le glioblastome est un type de tumeur du cerveau très malin avec des options thérapeutiques limitées, une forte récurrence et un taux de mortalité très élevé. Un lien étroit est désormais reconnu entre le développement tumoral et l'inflammation chronique. Cette association est attribuable au fait que les tissus inflammés procurent un environnement idéal pour la prolifération des cellules cancéreuses en leur fournissant plusieurs outils favorisant leur croissance au sein de ces tissus. Les prostaglandines et les cytokines sont associées à la pathogenèse de diverses conditions pathologiques dans le cerveau, dont le cancer de cerveau. L'interleukine-1 (IL-1), une cytokine pro-inflammatoire souvent exprimée dans les gliomes humains et exprimée dans les cellules tumorales et les macrophages, joue un rôle majeur dans l'orchestration de l'inflammation. Des études épidémiologiques indiquent que la consommation abondante d'aliments d'origine végétale permet de diminuer les risques de cancer. Cet effet chimiopréventif est lié à la haute teneur de ces aliments en composés phytochimiques, tels que les polyphénols, qui ont des propriétés anticancéreuses et anti-inflammatoires. Les objectifs de notre recherche ont été d'évaluer l'effet de la lutéoline, un flavonoïde retrouvé dans le poivron, le céleri, le thym et l'huile d'olive, sur l'expression de médiateurs pro-inflammatoires induite par l'IL-1 dans des cellules tumorales issues de glioblastomes (U87). *In vitro*, la lutéoline démontre une action biphasique en présence de l'IL-1 dans les U87 en induisant l'expression protéique et génique de la cyclooxygénase (COX)-2 à de faibles concentrations (5-15  $\mu$ M) tout en inhibant son expression à des concentrations plus élevées (20-50  $\mu$ M). Cette action spécifique de la lutéoline est également observée sur l'expression génique du récepteur à l'IL-1 (IL-1R). L'interaction synergique de l'IL-1 avec de faibles concentrations de lutéoline sur la hausse d'expression protéique et génique de la COX-2 est toujours maintenue, mais plus faiblement, en présence d'un antagoniste IL-1R. De plus, cette hausse s'accompagne d'une augmentation de translocation de NF- $\kappa$ B dans le noyau. L'activation de diverses protéines impliquées dans la voie de signalisation de l'IL-1R telles NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B, p38, ERK et JNK est, par contre, inhibée par la lutéoline de façon concentration dépendante. Nos résultats démontrent que la lutéoline module les voies inflammatoires NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B induites par l'IL-1 dans les glioblastomes suggérant que son action biphasique contribuerait aux propriétés bénéfiques de la lutéoline à contrer le développement tumoral.

Mots clés : glioblastome, inflammation, lutéoline, IL-1, COX-2, NF- $\kappa$ B.

## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

#### 1.1 Le cancer

##### 1.1.1 Généralités

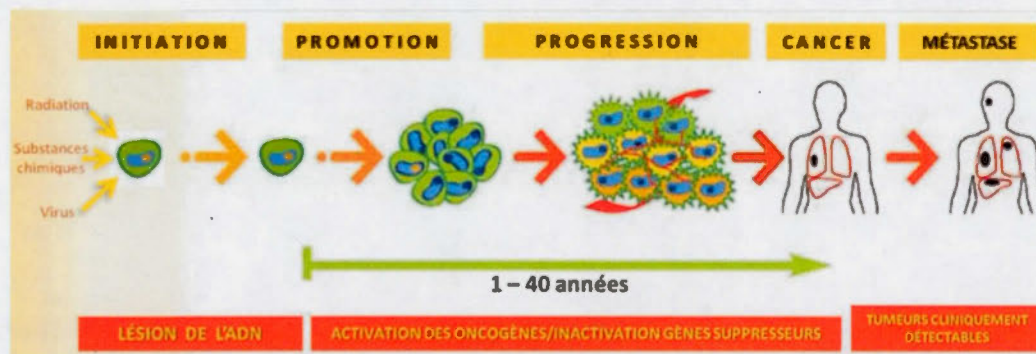
Le cancer englobe un groupe de maladies caractérisées par une croissance et une propagation incontrôlée des cellules anormales. Si la propagation de ces cellules anormales n'est pas contrôlée, elle peut entraîner la mort. Le cancer est causé par des facteurs externes tels le tabac, organismes infectieux, produits chimiques et rayons ionisants, et par des facteurs internes incluant les mutations héréditaires, hormones, conditions immunitaires, inflammations chroniques et des mutations qui se produisent à partir du métabolisme. Ces facteurs peuvent agir ensemble ou en séquence pour lancer ou inciter le développement du cancer (Luqman et Pezzuto, 2010).

Le développement tumoral chez les humains se produit à travers une période prolongée de temps, impliquant une série d'événements et un processus à plusieurs étapes distinctes: la phase d'initiation, la promotion et la progression (Neergheen *et al.*, 2009). Pendant ce processus, l'accumulation d'altérations génétiques et épigénétiques conduit à la transformation progressive d'une cellule normale en une cellule maligne. Les cellules cancéreuses acquièrent plusieurs compétences que la plupart des cellules saines ne possèdent pas: elles deviennent résistantes à l'inhibition de la croissance, elles prolifèrent indépendamment de l'action des facteurs de croissance, elles se reproduisent sans limites et elles échappent à l'apoptose (Hanahan et Weinberg, 2000). Les cellules cancéreuses peuvent également envahir les tissus voisins et se propager vers d'autres parties du corps par l'entremise du système lymphatique et sanguin, processus connu sous le nom de métastase.

Bien que les mécanismes par lesquels les cellules cancéreuses acquièrent ces capacités varient considérablement d'un type de tumeur à un autre, la plupart des changements physiologiques associés à ces mécanismes impliquent l'altération des voies

de transduction du signal. À ce jour, l'identité et le rôle des protéines impliquées dans les différentes étapes du développement tumoral sont mieux connus, ce qui offrira des possibilités d'identification des nouvelles cibles pour le développement thérapeutique (Gupta *et al.*, 2010).

Le cancer est la maladie qui correspond le mieux au paradigme : «*plus on sait, moins on comprend ses subtilités*» (Gupta *et al.*, 2010). De nos jours, il est connu que les phénotypes cancéreux sont le résultat de la dérégulation de plus de 500 gènes à des étapes différentes dans les voies de signalisation cellulaire. Cela indique qu'il est peu probable que l'inhibition du produit d'un seul gène ou d'une seule voie de signalisation cellulaire puisse prévenir ou traiter le cancer (Gupta *et al.*, 2010). Ironiquement, la plupart des traitements anticancéreux actuels ne mettent l'accent que sur une seule cible.



**Figure 1. Processus de développement des cancers.** Tous les cancers suivent le même processus de développement, composé de trois étapes majeures: l'initiation, la promotion et la progression. La phase d'initiation se produit sous l'action des agents cancérogènes comme les produits chimiques, les radiations ou les virus. La cellule normale subit des altérations irréversibles au niveau de son ADN. La phase de promotion tumorale est commencée lorsque la cellule mutée échappe au processus de réparation de l'ADN et déclenche la prolifération incontrôlée. Durant cette phase, la cellule est insensible aux signaux d'arrêt de croissance et les gènes suppresseurs sont inactivés. Un long laps de temps est nécessaire afin que la phase de progression s'établisse et que le cancer puisse être détectable. [Tirée de Béliveau et Gingras, 2007]



### 1.1.2 Statistiques

Malgré le développement de toutes les nouvelles thérapies, le cancer est un problème majeur de santé publique en Amérique du Nord, ainsi que dans de nombreuses autres parties du monde (Luqman et Pezzuto, 2010). Depuis 2005, le cancer est devenu la principale cause de mortalité au Canada, tuant un Canadien sur quatre. Les statistiques canadiennes de la Société de Recherche sur le Cancer rapportent un estimé de 187,600 nouveaux cas de cancer en 2013. En d'autres mots, chaque jour, toutes les trois minutes, quelqu'un recevra un diagnostic de cancer. De plus, une augmentation de la mortalité causée par le cancer a été estimée à plus de 100,000 morts par année jusqu'en 2030 au Canada (<http://www.crs-src.ca>, consulté le 29 juillet 2013).

### 1.1.3 Glioblastomes

Au cours de la dernière décennie, une amplification des cas des tumeurs cérébrales primaires a été constatée, le glioblastome étant le type histologique le plus fréquent et le plus malin de toutes les tumeurs cérébrales. Selon la *American Cancer Society*, plus de 20,000 nouveaux cas de cancer du cerveau et d'autres cancers du système nerveux ont été rapportés en 2007, occasionnant environ 13,000 décès (Jemal *et al.*, 2007). Les tumeurs cérébrales représentent également la principale cause de décès liée au cancer chez les enfants, et la quatrième chez les personnes d'âge moyen (Jemal *et al.*, 2011). Les gliomes sont les tumeurs cérébrales malignes les plus courantes, et représentent environ 70% de toutes les tumeurs cérébrales primaires. Les gliomes malins sont très vascularisés, et possèdent la capacité d'envahir les tissus environnants du cerveau. Malgré les progrès réalisés dans les traitements chirurgicaux et médicaux, ce type de cancer a conservé son mauvais pronostic (Shakur *et al.*, 2013).

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, les gliomes peuvent être divisés en quatre grades de malignité et en trois sous-types histologiques, le sous-type le plus commun étant l'astrocytome de grade IV (glioblastome). Les glioblastomes sont parmi les tumeurs les plus meurtrières avec une survie moyenne d'environ 16 mois (Niyazi *et al.*, 2011). L'agressivité des glioblastomes est attribuée à leur niveau élevé de prolifération, le niveau angiogénique rapide et la tendance à s'infiltrer parmi les tissus sains. La faible efficacité de la chimiothérapie actuellement, disponible pour les traitements de tumeurs

cérébrales, est en partie due à la présence de la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui sépare le sang du parenchyme cérébral et limite la pénétration de la plupart des médicaments dans le système nerveux central (Regina *et al.*, 2008).

Il a été observé dans les gliomes des altérations majeures dans les cascades de signalisation. Parmi celles-ci, la surexpression et/ou l'activation des facteurs de croissance [facteur de croissance épidermique (EGF), facteurs de croissance dérivés des plaquettes (PDGF)], des récepteurs aux facteurs de croissance [récepteurs de l'EGF (EGFR), récepteurs de PDGF (PDGFR)], des protéines de signalisation intracellulaires [phosphoinositide-3 kinase (PI3K)/AKT, MAPK/Ras], et des mutations des gènes suppresseurs de tumeurs [protéine p53, phosphatase lipidique PTEN (phosphatase et tensine de l'homologue supprimé sur le chromosome 10 (PTEN))] (Jiang *et al.*, 2010).

Le traitement du cancer du cerveau reste donc l'un des défis les plus importants en oncologie. Les traitements agressifs standards envers les tumeurs cérébrales, tels qu'une vaste résection chirurgicale, une dose élevée de radiations et de la chimiothérapie locale, peuvent amplifier le processus de destruction de la tumeur et retarder la récurrence tumorale. Toutefois, ces traitements peuvent aussi causer des dommages aux tissus adjacents, ce qui entraîne souvent des déficits des fonctions cognitives et motrices. Par conséquent, le développement de nouvelles stratégies visant à améliorer l'efficacité thérapeutique tout en minimisant la toxicité est désespérément nécessaire.

## 1.2 L'inflammation et le cancer

### 1.2.1 Généralités

L'inflammation est une réaction de défense du système immunitaire, causée par des dommages et des blessures aux tissus, caractérisée par une rougeur, une chaleur, un gonflement et une douleur. L'objectif principal de l'inflammation est de localiser et d'éliminer les irritants et de réparer les tissus environnants. L'inflammation est un processus nécessaire et bénéfique pour la survie d'une personne. Au contraire, il est bien connu qu'une inflammation chronique contribue à la fois à la progression et à la prédisposition des différents tissus au cancer ou à d'autres maladies (Keibel *et al.*, 2009).

Au cours des deux dernières décennies, beaucoup des recherches ont indiqué qu'au niveau moléculaire, la plupart des maladies chroniques, dont le cancer, sont causées par une réaction inflammatoire dérégulée et chronique (Gupta *et al.*, 2010). L'identification des facteurs de transcription tels que NF- $\kappa$ B, AP-1 et STAT3, et leurs produits géniques tels que le facteur de nécrose tumorale (TNF), l'interleukine-1 (IL-1), l'interleukine-6 (IL-6), les chimiokines, la cyclooxygénase-2 (Cox-2), la lipooxygénase, les métalloprotéases (MMPs) de la matrice extracellulaire, le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), les molécules d'adhésion et d'autres, ont fourni la base moléculaire du rôle de l'inflammation dans le cancer (Aggarwal et Gehlot, 2009). La majorité de ces molécules pro-inflammatoires, lesquelles régulent le recrutement séquentiel des leucocytes, sont fréquemment observées dans le microenvironnement de la tumeur (Keibel *et al.*, 2009). Le microenvironnement inflammatoire des tumeurs est caractérisé par la présence de macrophages associés aux tumeurs et de lymphocytes lesquels s'infiltrant dans les tumeurs qui produisent une gamme de cytokines pro-inflammatoires, en particulier : le TNF, les IL-1 et IL-6, les facteurs de croissance, des chimiokines comme l'IL-8 et des transducteurs de signal et des activateurs de transcription (STATs) (Neergheen *et al.*, 2009).

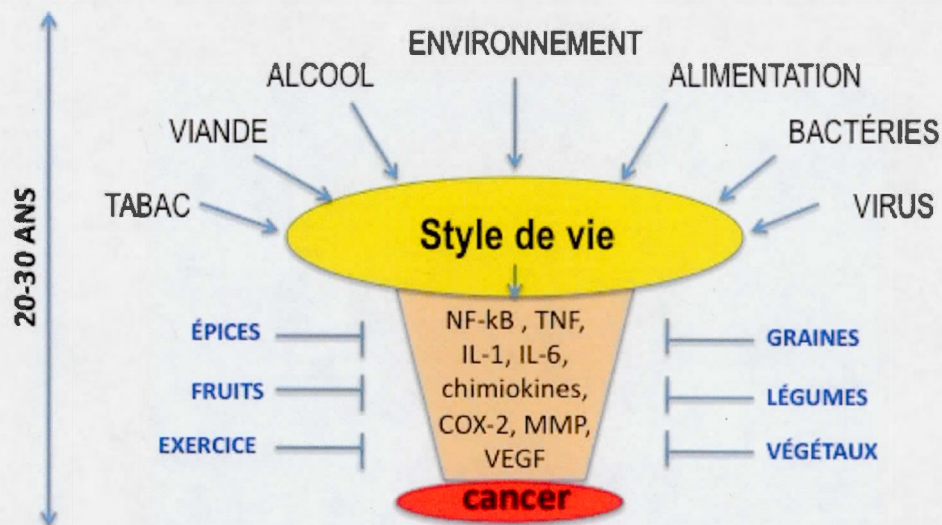
Les cytokinés et les chimiokines peuvent promouvoir la croissance, l'invasion et les métastases du cancer en provoquant des dommages à l'ADN par les ROS / RNS, en inhibant les mécanismes de réparation de l'ADN via ROS / RNS, par l'inactivation fonctionnelle des gènes suppresseurs de tumeurs; principalement du p53, par l'induction de la perméabilité vasculaire et l'activation des métalloprotéinases de la matrice extracellulaire, par la modulation des molécules d'adhérence cellulaire, par la stimulation de l'angiogenèse, et en favorisant la production de facteurs angiogéniques (VEGF, bFGF, l'IL-8, MMP) (Balkwill et Mantovani, 2001; Coussens et Werb, 2002). La contribution importante des processus inflammatoires dans la néoplasie a indiqué le rôle bénéfique des agents anti-inflammatoires dans la prévention du cancer.

Dans des conditions physiologiques normales, l'inflammation est associée à la production de divers radicaux libres et antioxydants qui, principalement, combattent et neutralisent les pathogènes envahisseurs et les corps étrangers, et détruisent également les tissus libres infectés de l'hôte. Cependant, l'inflammation chronique dans le cancer, mène à la production continue des radicaux libres qui s'accumulent dans les cellules et causent des dommages à d'autres molécules (comme l'ADN, les lipides et les protéines) en favorisant



la croissance des tumeurs. Des extraits de plantes à haut indice antioxydant peuvent se servir, du moins en partie, de leurs propriétés anticancéreuses, en agissant comme neutralisateurs de radicaux libres et des chélateurs de métaux (Neergheen *et al.*, 2009).

Les voies inflammatoires sont activées par le tabac, le stress, l'obésité, l'alcool, les agents infectieux, les radiations, et les stimuli environnementaux, et représentent ainsi l'ensemble de presque 95% de tous les cancers (figure 2), (Aggarwal et Gehlot, 2009).



**Figure 2. Lien entre l'inflammation et le cancer.** Les molécules qui jouent un rôle crucial dans l'inflammation sont régulées par le facteur de transcription NF-kB dont l'activation est liée au style de vie. Une saine alimentation composée de légumes, fruits, graines et épices ainsi que l'exercice physique vont aider à supprimer l'inflammation. [Adaptée de Aggarwal et Gehlot, 2009]

### 1.2.2 Cytokine pro-inflammatoire: Interleukine-1 (IL-1)

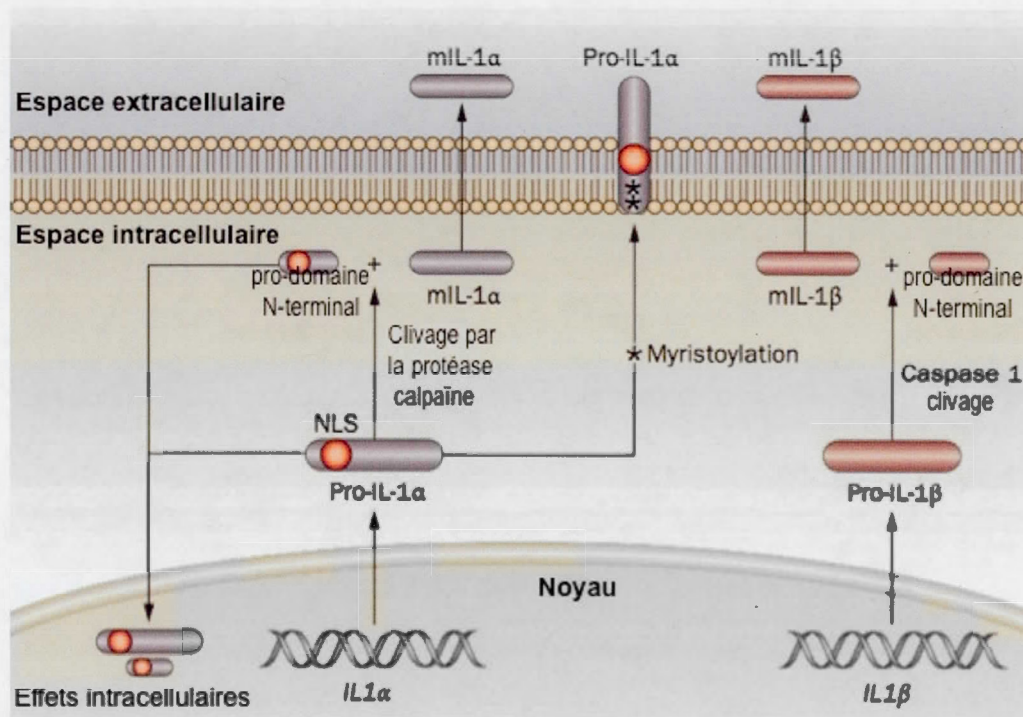
L'IL-1 est l'un des principaux régulateurs de l'inflammation et des réponses immunitaires, étant une cytokine neuroinflammatoire majeure dans le cerveau qui est libérée en réponse à une lésion ou une tumeur croissante (Rothwell et Luheshi, 2000). L'IL-1 peut induire la sécrétion d'autres cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-6 et IL-8, et peut promouvoir la prolifération de cellules de glioblastomes. De plus, l'IL-1 a été impliquée dans la tumorigenèse, l'invasivité des tumeurs et les métastases de différentes cellules cancéreuses (Apte *et al.*, 2006). Plus important encore, il a été récemment montré que les cellules de glioblastomes sécrètent d'importantes quantités d'IL-1 (Lu *et al.*, 2007). Les cytokines sont des protéines solubles de faible poids moléculaire qui transmettent des signaux entre les cellules et qui sont impliquées dans plusieurs maladies. Les cytokines pro-inflammatoires, incluant l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukine-6 (IL-6), interleukine-8 (IL-8), et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ) sont impliquées dans ces processus pathologiques. La régulation à la hausse de ces cytokines est directement liée à l'inflammation chronique et au cancer (Pratheeshkumar *et al.*, 2012).

L'IL-1 appartient à une famille de cytokines comprenant 11 protéines (IL-1F1 à l'IL-1F11) codées par 11 gènes distincts (IL1A, IL1B, IL1RN, IL18, IL1F5 à IL1F11 chez les humains, et Il1A à Ilf1 chez les souris). La fonction principale de ce type de cytokines est de contrôler les réactions pro-inflammatoires par des motifs moléculaires associés à des pathogènes, en réponse à une lésion tissulaire. Les membres de la famille d'IL-1 sont des médiateurs de réactions immunitaires innées et qui possèdent des actions bien équilibrées (Weber *et al.*, 2010).

Le terme IL-1 a été utilisé afin de décrire le médiateur de diverses activités biologiques. Il a été révélé que ces dernières sont régulées, en fait, par deux cytokines associées l'une à l'autre, l'IL-1 $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ , qui se lient au même récepteur et stimulent des signaux intracellulaires similaires. Les gènes codant pour l'IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  sont situés sur le chromosome 2 (Copeland *et al.*, 1991). Malgré leur faible niveau d'homologie dans leur séquence d'acides aminés de seulement 24%, l'IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  partagent une structure tridimensionnelle semblable et une fonction biologique presque identique (Weber *et al.*, 2010). Les deux cytokines sont produites principalement par des monocytes et des macrophages stimulés, mais ils peuvent aussi être exprimés par plusieurs autres types

cellulaires, tels les neutrophiles, les kératinocytes, les cellules épithéliales et endothéliales, les lymphocytes, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes (Dinarello, 1994).

L'IL-1 $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  sont synthétisés sous forme de précurseurs peptidiques de 31 kDa (pro-IL-1 $\alpha$  et pro-IL-1 $\beta$ ), qui peuvent être clivés afin de générer des formes matures de 17 kDa (mIL-1 $\alpha$  et mIL-1 $\beta$ ). Les deux cytokines sont exemptes de peptides signaux, et sont donc sécrétées par une voie indépendante non conventionnelle du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. Les deux protéines IL-1 ont des localisations subcellulaires différentes et différents mécanismes de maturation et de sécrétion (figure 3) (Gabay *et al.*, 2010).



**Figure. 3. La synthèse, la maturation et la localisation cellulaire de l'IL-1 $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ .** Ces deux protéines sont synthétisées à partir de deux gènes distincts sous forme de précurseurs pro-peptidiques (pro-IL-1 $\alpha$  et IL-pro-1 $\beta$ ), sans séquence de signal. La pro-IL-1 $\beta$  est clivée par la caspase 1 en mIL-1 $\beta$ , et peut être sécrétée comme une protéine soluble et active. La pro-IL-1 $\alpha$  est biologiquement active et contient une séquence de localisation nucléaire dans la région N-terminale. Après myristoylation, la pro-IL-1 $\alpha$  est également exprimée sous forme d'une cytokine membranaire. Parfois, la forme du précurseur peut être clivée par une protéase *calpaïne-like* pour générer la mIL-1 $\alpha$  et un pro-domaine N-terminal. Comme pour la pro-IL-1 $\alpha$ , le pro-domaine N-terminal peut exercer des activités intracellulaires indépendamment de la liaison au récepteur de surface cellulaire. Une translocation nucléaire semble être requise pour les effets intracellulaires de la pro-IL-1 $\alpha$  et le pro-domaine N-terminal. [Adaptée de Gabay *et al.*, 2010].



L'IL-1 $\alpha$  est activée soit en tant que précurseur, soit associée à la surface membranaire de plusieurs types cellulaires. L'IL-1 $\alpha$  reste au niveau cytosolique et semble être impliquée dans la signalisation paracrine entre les cellules. L'IL-1 $\alpha$  est rarement détectée dans le sang ou dans d'autres fluides corporels chez les êtres humains, sauf pendant les maladies graves, où elle peut être libérée par les cellules mourantes. De plus, la pro-IL-1 $\alpha$  exerce également des activités intracellulaires indépendantes de sa liaison aux récepteurs de surface cellulaire (Voronov *et al.*, 2003; Gabay *et al.*, 2010).

L'IL-1 $\beta$  est biologiquement inactive et devient active uniquement suite à sa sécrétion sous forme de produit mature lorsqu'il y a conversion de la Pro-IL-1 $\beta$  en 17 kDa mIL-1 $\beta$ . (Gabay *et al.*, 2010). L'IL-1 $\beta$  est transformée et libérée par les cellules suivant un mécanisme impliquant la caspase-1. L'activation de la caspase-1 est régulée par un complexe protéique cytosolique multimérique, appelé l'inflammasome. L'IL-1 $\beta$  est abondamment sécrétée par les macrophages activés et les monocytes sanguins. Deux signaux sont nécessaires pour la libération d'IL-1 $\beta$  par les macrophages primaires: premièrement, l'activation du Toll-like récepteurs (TLR), résultant de la transcription et de la traduction des pro-IL-1 $\beta$ , et deuxièmement, l'induction de l'IL-1 $\beta$  par le NLR et sa libération par un mécanisme caspase-1-dépendant (Netea, 2009). De plus, l'IL-1 $\beta$  est présente dans la circulation sanguine des patients subissant des réponses infectieuses ou inflammatoires (Voronov *et al.*, 2003).

L'IL-1 $\beta$  exerce un grand nombre de ses effets biologiques par l'activation du facteur de transcription NF-kB, qui, à son tour, régule l'expression de gènes inflammatoires et oncogéniques (Farrow et Evers, 2002). Il est connu que l'IL-1 $\beta$  est régulé à la hausse dans de nombreux types de tumeurs et qu'elle est impliquée dans la progression tumorale par l'intermédiaire de l'expression de gènes angiogéniques et métastatiques et des facteurs de croissance (Voronov *et al.*, 2003; Saijo *et al.*, 2002). Un certain nombre d'études a rapporté que des hautes concentrations d'IL-1 $\beta$  dans le microenvironnement de la tumeur sont associées à un phénotype tumoral plus virulent. Le mécanisme exact par lequel l'IL-1 exerce son effet prolifératif et angiogénique est inconnu, mais il est postulé que les interactions au sein du microenvironnement de la tumeur sont une composante importante (Lewis *et al.*, 2006).

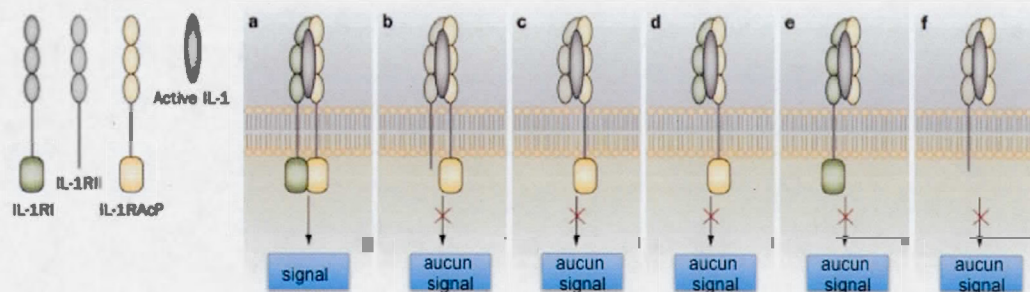
### 1.2.3 Les récepteurs d'interleukine

#### 1.2.3.1 Les récepteurs d'interleukine-1

Les activités biologiques de l'IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  sont accordées par la liaison au récepteur d'IL-1 de type I (IL-1RI), appartenant à la famille Toll (O'Neill, 1995). Ce récepteur est exprimé à la surface d'une grande variété de cellules permettant ainsi les grandes diversifications de réponses biologiques induites par l'IL-1. L'IL-1RI contient trois domaines d'immunoglobuline extracellulaires et un domaine intracellulaire qui partage une certaine homologie avec les autres membres de l'IL-1R et de la famille TLR, connu sous le nom de domaine Toll-like / IL-1R (TIR) (Gabay *et al.*, 2010). L'interaction de l'IL-1 $\alpha$  ou de l'IL-1 $\beta$  avec la partie extracellulaire d'IL-1RI, induit le recrutement d'une seconde chaîne de récepteur, appelé protéine accessoire du récepteur d'IL-1 (IL-1RAcP) (figure 4). Cette protéine accessoire IL-1RAcP sert de corécepteur, requis pour la transduction du signal du complexe IL-1 / IL-1 RI. Ce complexe temporaire formé par ces trois composantes l'IL-1, IL-1RI et l'IL-1RAcP, recrute un certain nombre de molécules adaptatrices intracellulaires dont: le facteur myéloïde de différenciation 88 (MyD88), les kinases associées à l'IL-1R (IRAK) et le facteur 6 associé au récepteur du TNF (TRAF6). Il active par la suite diverses voies de signalisation par l'intermédiaire du NF-kB, p38, c-Jun kinases N-terminal (JNK), la protéine kinase régulatrice des signaux extracellulaires (ERK) et des protéines MAPKs (Yao *et al.*, 2007).

#### 1.2.3.2 Les récepteurs d'interleukine-II

Les IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  peuvent également se lier au récepteur d'IL-1 de type II (IL-1RII). La particularité de ce récepteur est l'absence d'une partie cytosolique nécessaire pour la signalisation et donc ne sert que de récepteur-leurre seulement (O'Neill, 1995). L'IL-1 $\beta$  se lie à l'IL-1RII avec une plus grande affinité que l'IL-1 $\alpha$  et l'IL-1 Ra. Ancré à la surface membranaire, l'IL-1RII peut agir à titre de modulateur dominant négatif pour la signalisation cellulaire, en formant un complexe avec l'IL-1 et IL-1RAcP sans aucun signal (figure 4) (Weber *et al.*, 2010).



**Figure 4. Régulation de l'activité de l'IL-1 par les deux formes membranaires et solubles des récepteurs de l'IL-1.** a) Les activités biologiques de l'IL-1 sont modulées par leur liaison au récepteur de la surface cellulaire de l'IL-1RI. La liaison de l'IL-1 induit un changement de conformation dans la partie extracellulaire de l'IL-1RI, permettant son interaction avec l'IL-1RAcP, qui est nécessaire pour la signalisation intracellulaire. b) L'IL-1RII peut seulement agir comme un récepteur-leurre sur la surface de la cellule ou c) sous forme soluble dans le milieu extracellulaire après clivage enzymatique de son domaine extracellulaire. L'IL-1RII soluble antagonise l'activité de l'IL-1. d) L'IL-1RI et e) l'IL-1RAcP existent aussi sous formes solubles, produites par le clivage du domaine extracellulaire et suivies d'un épissage alternatif. L'IL-1RAcP soluble peut former un complexe inactif avec l'IL-1RI liée à l'IL-1, et f) augmenter également le potentiel inhibiteur de l'IL-1RII sur l'action de l'IL-1. [Adaptée de Gabay *et al.*, 2010].

#### 1.2.3.3 L'antagoniste du récepteur d'interleukine 1 (IL-1 Ra).

Un troisième ligand spécifique au récepteur IL-1RI est une cytokine d'origine naturelle qui fonctionne comme un antagoniste spécifique du récepteur d'IL-1 (IL-1 Ra). L'IL-1Ra agit comme un inhibiteur compétitif de la liaison de l'IL-1 à son récepteur, et lie l'IL-1RI avec une spécificité et une affinité similaire, mais n'active pas le récepteur et donc ne déclenche aucune signalisation en aval (Weber *et al.*, 2010). Toutefois, malgré cette affinité similaire de l'IL-1 et l'IL-1Ra pour l'IL-1RI, un large excès molaire d'IL-1 Ra (de 100 à 1000 fois plus) est nécessaire afin de bloquer l'activité de l'IL-1 *in vitro* et *in vivo*. Ces résultats s'expliquent par le niveau élevé d'IL-1RI exprimé sur la plupart des cellules, et le fait que l'engagement de quelques récepteurs de l'IL-1 est suffisant pour activer pleinement ces réponses cellulaires (Gabay *et al.*, 2010).

L'IL-1 Ra est produite sous forme de quatre isoformes différentes. Une de ces isoformes est sécrétée (sIL-1 Ra), tandis que les trois autres restent intracellulaires, car



elles n'ont pas de séquences consensus\* (icIL-1Ra1, icIL-1Ra2 et icIL-1Ra3). Ces isoformes intracellulaires peuvent être libérées par les cellules sur le point de mourir et se lient à l'IL-1RI (Gabay *et al.*, 2010).

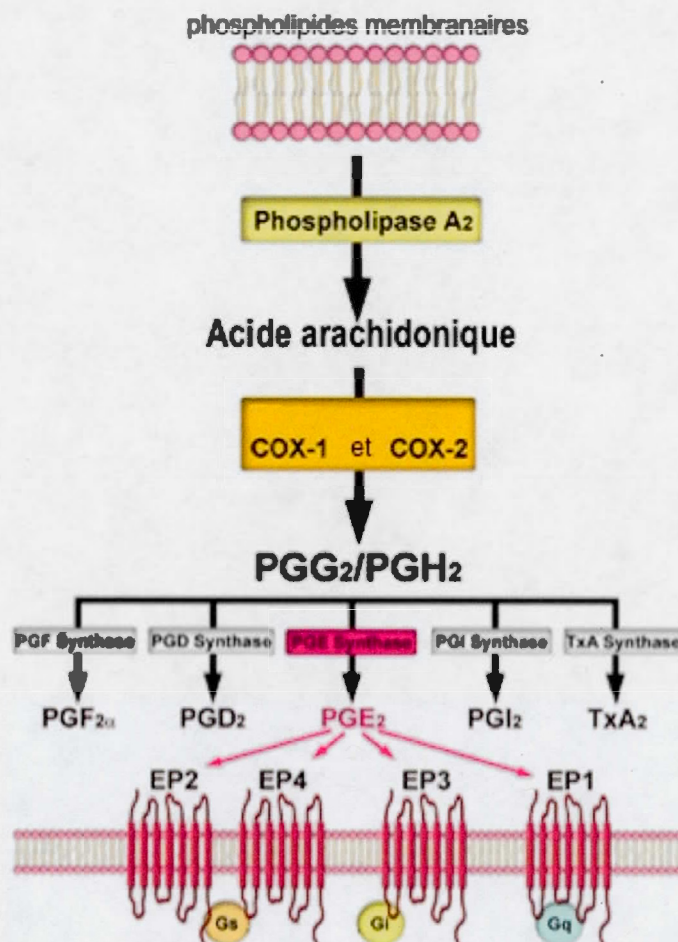
#### 1.2.4 Les cyclooxygénases

La cyclooxygénase (COX)-2 est une enzyme inductible par des médiateurs inflammatoires et des cytokines telles IL-1, IL-6 et TNF- $\alpha$ , responsable de la production de prostaglandines dans les sites d'inflammation. En réponse à divers facteurs de croissance, des hormones ou des cytokines, l'acide arachidonique peut être mobilisé à partir de phospholipides et transformé en eicosanoïdes bioactifs par la COX. La voie COX-2 génère cinq prostanoïdes majeurs, la prostaglandine D2, la prostaglandine E2, la prostaglandine F2 $\alpha$ , la prostaglandine I2 et la thromboxane A2, qui jouent un rôle important dans divers processus biologiques (Wang *et al.*, 2007).

La biosynthèse des prostanoïdes implique une séquence de trois étapes. Premièrement, la libération d'acide arachidonique à partir des phospholipides sécrétés ou cytoplasmiques, ou même les deux types de phospholipase A2 (sPLA2, cPLA2) (Shinohara *et al.*, 1999). Deuxièmement, une oxygénation de l'acide arachidonique par la COX-2 pour former la prostaglandine endoperoxyde H2 (PGH2) (également connue sous le nom prostaglandine H2 synthases, PGHS). Et troisièmement, la conversion subséquente de la PGH2 dans les cinq prostanoïdes primaires PGD2, PGE2, PGF2, PGI2 (prostacycline) ou TXA2 (thromboxane A2) par des synthases spécifiques (ou isomérases) (figure 5) (Kuwamoto *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1992).

---

\* Séquence idéalisée d'un acide nucléique ou d'une protéine dans laquelle chaque position représente la base ou l'acide aminé rencontré le plus fréquemment. Un ensemble connu de la séquence conservée est représenté par une séquence de consensus. Les structures primaires de protéines fréquemment observées (motifs des acides aminés) sont souvent formées par des séquences conservées. Dans le cas de séquences très spécifiques, cette simple séquence suffit pour décrire de manière satisfaisante une région active (<http://www.termsscience.fr>).



**Figure 5. Biosynthèse des prostanoïdes.** La COX-2 et la COX-1 catalysent l'oxydation de l'acide arachidonique en deux intermédiaires instables, la prostaglandine endoperoxyde G2 (PGG2) et la prostaglandine H2 (PGH2). À l'aide des synthases spécifiques, la PGH2 et la PGG2 sont transformées en d'autres prostaglandines (PGD2, PGF2 $\alpha$ , PGE2, PGI2, TXA2). Une fois synthétisée, la PGE2 diffuse immédiatement et active ses récepteurs prostanoïdes E-spécifiques (EP1-4) qui appartiennent à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à la protéine G. [Adapté de Clasadonte *et al.*, 2011]

Les prostanoïdes modulent l'aggrégation plaquettaire, l'homéostasie rénale, l'homéostasie vasculaire, la régulation de l'inflammation et beaucoup d'autres processus. Des études suggèrent que les différents prostanoïdes et leurs propres synthases peuvent jouer des rôles distincts dans la progression tumorale et les métastases du cancer. La COX-2 et la PGE2 sont les synthases les plus étudiées et documentées dans la littérature scientifique pour la régulation de divers aspects de la progression tumorale et de la métastase (Wang *et al.*, 2007).

À ce jour, trois isoenzymes de COX ont été identifiés: COX-1, COX-2 et COX-3. COX-3 est un variant d'épissage de la COX-1, qui conserve l'intron 1 et possède une mutation du cadre de lecture. Toutefois, certains scientifiques préfèrent utiliser le nom de la COX-1b ou COX-1variant (COX-1v). Cette enzyme est similaire à la COX-1 et COX-2 en termes de structure et de fonction enzymatique. Quoique, la rétention de l'intron dans le COX-3 ralentie son activité enzymatique par rapport à la COX-1 et COX-2 (Wang *et al.*, 2007). Les autres isoformes, COX-1 et COX-2, diffèrent principalement par leurs modes d'expressions. Bien que la COX-1 et COX-2 opèrent fondamentalement de la même façon et partagent une homologie de 61% dans les séquences d'acides aminés, l'inhibition sélective peut faire une différence en termes d'effets secondaires. La COX-1 est exprimée de manière constitutive dans la plupart des tissus et joue un rôle dans la production des prostaglandines qui contrôle des processus physiologiques normaux. Par conséquent, la COX-1 est responsable de la synthèse des PG de ménage (Ghosh *et al.*, 2010).

D'autre part, la COX-2 est indétectable dans la plupart des tissus normaux (sauf pour le système nerveux central, les reins et les vésicules séminales), mais est induite par différents stimuli inflammatoires et mitogènes. COX-2 est régulée au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel par les facteurs de croissance EGF et PDGF, les cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  et IL-2, TNF, les promoteurs de tumeurs et finalement, les acides biliaires et l'irradiation ultraviolette B (Chen *et al.*, 2001; Dempke *et al.*, 2001; Peppelenbosch *et al.*, 1993). COX-2 a été reliée à la prolifération des cellules tumorales. Des rapports ont démontré des quantités accrues de COX-2 dans les tissus précancéreux et cancéreux (Dannenberg *et al.*, 2001). De plus, COX-2 est liée à la formation de cancérogènes, à la promotion de la tumeur et à l'inhibition de l'apoptose, de l'angiogenèse et du processus métastatique. (Maier *et al.*, 1990; DuBois *et al.*, 1994).

Bien que le mécanisme de régulation à la hausse de la COX-2 n'est pas complètement élucidé, des hypothèses suggèrent qu'il résulte de l'activation de Ras et de la voie de MAPK (Sheng *et al.*, 2000; Sheng *et al.*, 1998). Il a été reconnu que l'activité de la protéine kinase B (Akt / PKB) est impliquée dans l'expression de la COX-2 induite par K-Ras, et que la stabilisation de l'ARNm du COX-2 dépend en partie de l'activation de la voie Akt / PKB (Sheng *et al.*, 2000). Ces voies conduisent à l'activation des facteurs de régulation qui se lient, éventuellement, à la région promotrice du gène COX-2. Cette

région contient plusieurs éléments de réponses à des facteurs de transcription, dont le facteur nucléaire kappa B (NF-kB) (Rodrigues *et al.*, 2004).

#### 1.2.5 Le facteur nucléaire kappa B (NF-kB)

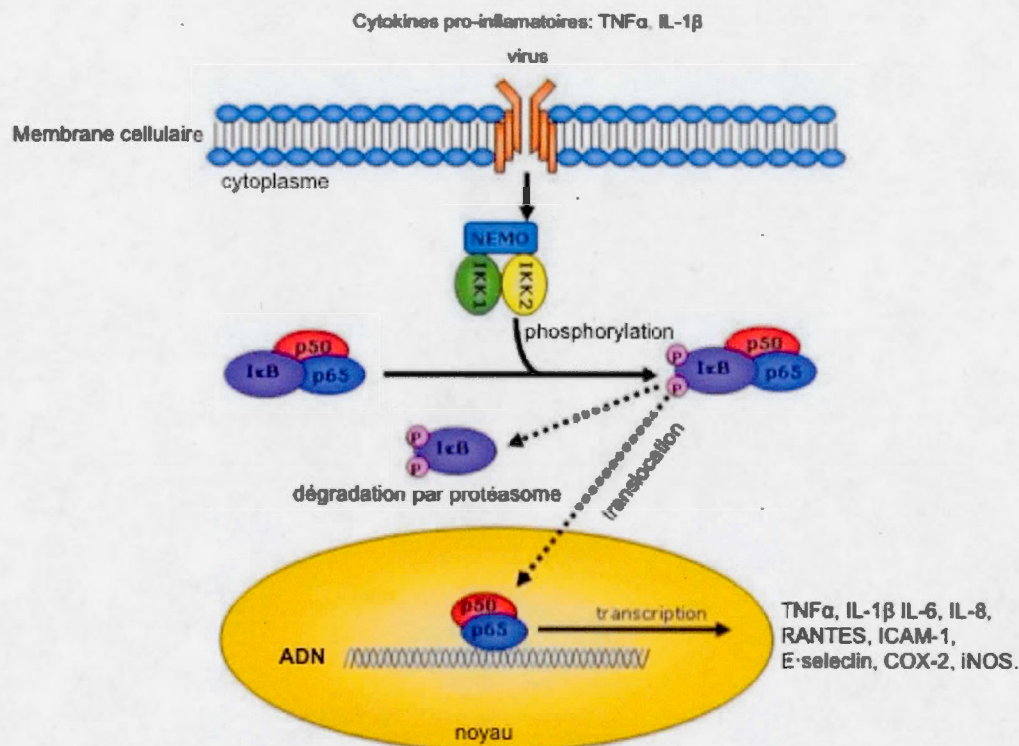
Un des liens les plus importants entre l'inflammation et le cancer est le facteur nucléaire pro-inflammatoire kappa B (NF-kB). Le NF-kB est un facteur de transcription ubiquitaire qui régule l'expression des gènes impliqués dans la transformation, la survie, la prolifération, l'invasion, l'angiogenèse et la métastase des cellules tumorales. De plus NF-kB contrôle l'expression des gènes impliqués dans un certain nombre de réactions physiologiques, y compris les réponses immunitaires inflammatoires, les réactions inflammatoires de la phase aiguë, les réponses au stress oxydatif, l'adhésion cellulaire, la différenciation et l'apoptose (Gupta *et al.*, 2010). Les gènes activés par NF-kB comprennent plusieurs cytokines [TNF $\alpha$ , l'IL-1, IL-6 et "granulocyte-macrophage colony stimulating factor" (GM-CSF)], chimiokines [IL-8, 'macrophages inflammatory protein' (MIP)-1 $\alpha$ , 'méthyl-accepting chemotaxis protein 1' (MCP1)], les molécules d'adhésion [E-sélectine, les molécules vasculaires d'adhésion cellulaire 1 (VCAM-1), les molécules intracellulaires d'adhésion cellulaire 1 (ICAM-1)], l'enzyme inducible COX-2 et de synthase inducible de l'oxyde nitrique (iNOS) (figure 6). Plusieurs de ces produits, tels que le TNF $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ , activent directement la voie NF-kB pour établir une boucle autorégulatrice positive pouvant amplifier et augmenter la durée de la réponse inflammatoire (Yamamoto et Gaynor, 2004).

Le facteur NF-kB appartient à la famille des protéines Rel qui comprend cinq membres, c-Rel, RelA (p65), RelB, NF- $\kappa$ B1 (p50 et son précurseur p105) et NF- $\kappa$ B2 (p52 et son précurseur p100) qui peuvent tous former des hétéro- ou homodimères (Gupta *et al.*, 2010). Tous les cinq membres de cette famille partagent un domaine N-terminal d'environ 300 acides aminés, désigné le *Rel-homologie-domaine* (RHD), qui assure la capacité de leur liaison à l'ADN, leur dimérisation et leur translocation nucléaire. Trois membres de la famille de NF-kB, p65, RelB et c-Rel, comprennent des domaines d'activation transcriptionnelle C-terminaux (TAD) qui sont essentiels à leur capacité à activer l'expression génique. Deux membres de la famille NF-kB, le p50 et le p52, sont synthétisés sous forme de protéines précurseurs, respectivement p105 et p100, qui contiennent une séquence RHD N-terminal (Yamamoto et Gaynor, 2004).



Une dimérisation des membres de la famille NF- $\kappa$ B est nécessaire pour leurs propriétés de liaison à l'ADN. Des combinaisons multiples homo- et hétérodimères de ces facteurs se lient aux séquences  $\kappa$ B dans les promoteurs de gènes régulés par le NF- $\kappa$ B, entraînant des modèles uniques d'activation transcriptionnelle (Zhong *et al.*, 2002; Saccani *et al.*, 2003). L'hétérodimère p65-p50 a été classifié comme étant la forme classique de NF- $\kappa$ B qui se lie aux sites  $\kappa$ B. Bien que l'homodimère RelB ne se lie pas aux sites NF- $\kappa$ B, ses hétérodimères peuvent conduire à la médiation de RelB. Les deux sous-unités, p50 et p52, peuvent également former des hétérodimères transcriptionnels actifs, soit avec p65 ou soit avec c-Rel. Les homodimères de p50 ou p52 peuvent aussi se lier à des séquences NF- $\kappa$ B. Dans la plupart des tissus, ces protéines ont une capacité d'activation de la transcription très faible parce qu'ils n'ont pas un domaine de transactivation classique. Cependant, ces homodimères peuvent également réprimer l'expression de leurs gènes cibles (figure 6) (Li et Verma, 2002).

Dans les cellules non stimulées, les protéines NF- $\kappa$ B résident dans le cytoplasme sous forme d'hétérotrimères constituées de p50-p65 et associées à des membres appartenant à une famille de protéines inhibitrices I $\kappa$ B. Cette famille est constituée de l'I $\kappa$ B $\alpha$ , l'I $\kappa$ B $\beta$ , l'I $\kappa$ B $\epsilon$  et l'I $\kappa$ B $\gamma$ . La spécificité de ces protéines est octroyée par leurs séquences répétitives alkyrin en C- terminal, qui sont essentielles à leur interaction avec les protéines NF- $\kappa$ B. Les études structurales ont indiqué que l'I $\kappa$ B $\alpha$  masque le signal de localisation nucléaire du p65, mais pas celui du p50, ce qui permet de moduler l'apport nucléaire de l'I $\kappa$ B $\alpha$  avec le complexe p50-p65. Le transport constant de l'I $\kappa$ B $\alpha$  entre le cytoplasme et le noyau est probablement un mécanisme crucial pour le maintien de la localisation cytoplasmique du complexe I $\kappa$ B $\alpha$ -p50-p65 (Luqman et Puzzuto, 2010).



**Figure 6. La voie de signalisation classique de NF-κB.** La cascade de la voie classique ou canonique du NF-κB est généralement activée lors de la stimulation par des cytokines pro-inflammatoires, IL-1β et TNF-α, ou par les virus. La phosphorylation d'IκB par l'IKK activée libère les sous-unités p50-p65, qui se déplacent au noyau et qui se lient à l'ADN afin d'induire la transcription des gènes cibles. L'IκB phosphorylée est dégradée par le protéasome. [Adaptée de Belvisi, National Heart and Lung Institute (NHLI); <http://www1.imperial.ac.uk/nhli/respiratory/airdisease/pharmacology/>]

Une large variété de stimuli qui activent la voie NF-κB, dont les cytokines, les chimiokines, les produits bactériens et viraux, les rayonnements UV et les radicaux libres, peut induire la phosphorylation de la protéine IκBα. Ainsi, la phosphorylation de l'IκBα par les IKK activées, résulte dans une ubiquitination et ensuite d'une dégradation par le protéasome. La dégradation d'IκBα se produit généralement entre 5 et 30 minutes selon l'origine de la stimulation. Quand à IκBε, sa dégradation se fait entre 60 et 90 minutes (Kanarek et Ben-Neriah, 2012).

Le complexe IKK contient deux sous-unités kinases, IKKα (IKK1) et IKKβ (IKK2), et une sous-unité régulatrice, NEMO (modificateur essentiel de NF-κB) ou IKKγ.



Dans la voie de signalisation NF- $\kappa$ B classique, l'IKK $\beta$  est à la fois nécessaire et suffisante pour la phosphorylation de l'I $\kappa$ B $\alpha$  et l'I $\kappa$ B $\beta$ . Le rôle d'IKK $\alpha$  dans la voie classique n'est pas clair, bien que des études récentes suggèrent qu'il peut réguler l'expression des gènes en modifiant l'état de phosphorylation des histones (Hayden et Ghosh, 2004). La phosphorylation et la dégradation de l'I $\kappa$ B $\alpha$ , représentant l'étape clé dans la régulation de la voie de NF- $\kappa$ B, permettent la libération des sous-unités p50 et p65 et par la suite leur translocation vers le noyau. Les hétérodimères se lieront alors aux séquences spécifiques d'ADN présentes sur les promoteurs de différents gènes, ce qui va initier la transcription de ces gènes (figure 6) (Gupta, Kim *et al.*, 2010).

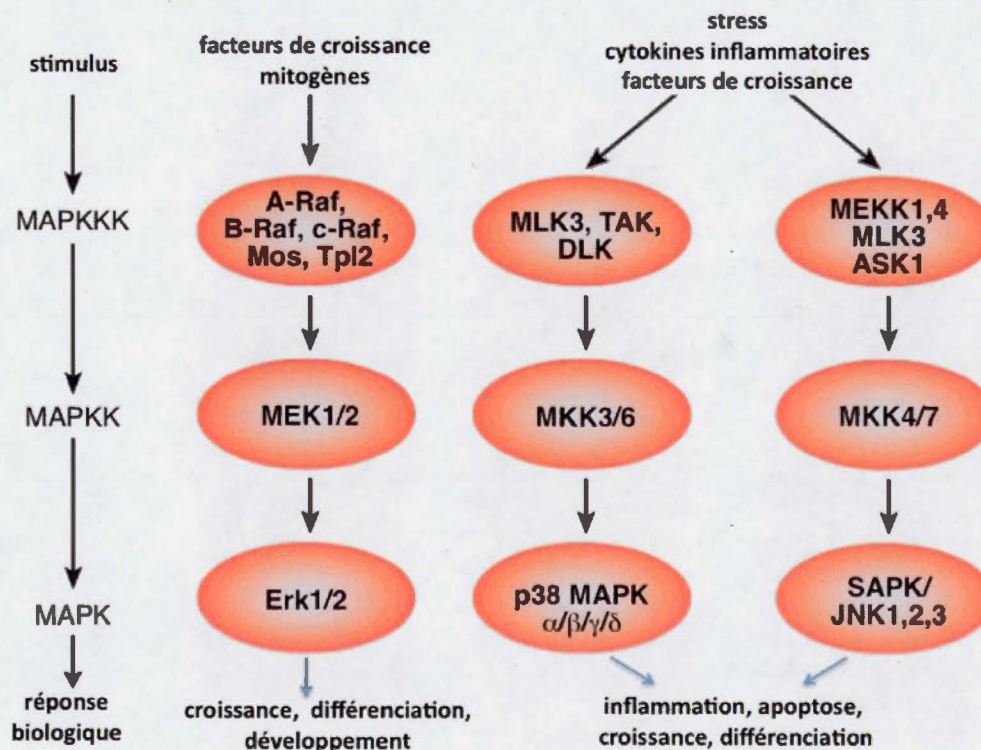
Un certain nombre de protéines est impliqué dans la voie de signalisation NF- $\kappa$ B. En raison de la pertinence de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B dans le cancer, cette voie représente une cible intéressante pour le développement thérapeutique. En effet, plus de 700 inhibiteurs de la voie d'activation de NF- $\kappa$ B ont été signalés, notamment des antioxydants, des peptides, des protéines microbiennes et virales (Gupta, Kim *et al.*, 2010).

### 1.3 Les voies de signalisation intracellulaires impliquées dans le cancer

#### 1.3.1 La voie des MAP kinases

Les cascades MAPKs fonctionnent en aval des récepteurs de surface cellulaire et d'autres protéines de signalisation cytoplasmiques dont les fonctions sont dérégulées dans le cancer et d'autres troubles pathologiques humains (Roberts et Der, 2007). Les réponses cellulaires à de nombreux stimuli externes impliquent l'activation de plusieurs types des voies de signalisation de MAPKs. Les protéines MAP kinases appartiennent à la superfamille des sérines / thréonine kinases et jouent un rôle central dans la transduction des différents signaux extracellulaires (Cobb et Goldsmith, 1995). Les cascades MAPK sont organisées en trois grands niveaux de régulation: (1) une MAP kinase kinase kinase (MAPKKK), qui phosphoryle et active (2) une MAP kinase kinase (MAPKK), qui à son tour, phosphoryle et active (3) une MAPK (figure 7) (Cobb et Goldsmith, 1995). Malgré la diversité des fonctions et des événements de signalisation en amont, les MAPKs sont toujours activées par un mécanisme hautement conservé qui implique une phosphorylation sur les deux résidus, respectivement la thréonine (Thr) à la position 180 (Mittelstadt *et al.*, 2005) et la tyrosine (Tyr) à la position 182 (Mittelstadt *et al.*, 2005) catalysée par une

kinase MAPK. Les MAPKs comprennent 3 principaux sous-groupes de protéines dont les voies sont le mieux caractérisées: la voie d'ERK, la voie de JNK/SAPK et la voie de p38 MAPK (Karin, 1995).



**Figure 7. Représentation schématique des voies de signalisation des MAPKs.** Les MAPkinases sont organisés comme une cascade de signalisation, dans laquelle elles sont activées par une kinase MAPKKK et qui sont eux-mêmes activés par la suite par un type de kinases, MAPKKK, très diversifié. Les classes les plus importantes des MAPKs y sont représentées dans la figure : les voies d'ERK, p38 et JNK/SAPK. [Adaptée de Cell Signaling]

#### 1.3.1.1 La voie ERK

L'initiation de la cascade ERK / MAPK implique l'activation de trois kinases: Ras → Raf → MEK → ERK/MAPK (Wang *et al.*, 2011). La voie ERK est activée lorsque Ras recrute c-Raf (un MAPKKK) à la membrane, ce qui entraîne son activation. Une fois activée, Raf phosphoryle et active ensuite MEK1/2 (MAPKK), qui active directement ERK par une double phosphorylation sur les résidus thréonine 202 et tyrosine 204, dans le

motif tri-peptidique. La voie ERK est très sensible aux facteurs de croissance et aux signaux reçus de certains récepteurs couplés aux protéines G et à la protéine kinase C, ainsi qu'aux récepteurs à activité tyrosine-kinase (Roberts et Der, 2007).

La voie ERK / MAPK est traditionnellement appelée à jouer un rôle important dans la prolifération et la différenciation cellulaire, mais elle est aussi impliquée dans la mobilité et l'apoptose cellulaire (Wang *et al.*, 2011). L'activation d'ERK se produit suite à l'inflammation et / ou aux lésions. Par exemple, lors d'une lésion du nerf, le niveau d'ERK phosphorylé augmente séquentiellement dans les neurones, les astrocytes et les microglies (Wang *et al.*, 2011). Dans le cas d'un cancer, la signalisation de la voie ERK est aberrante stimulée en particulier par l'activation en amont du récepteur épidermique de facteur de croissance EGFR et les protéines Ras (GTPases), en favorisant la prolifération et la survie cellulaire, ainsi que la métastase des cellules cancéreuses (Roberts et Der, 2007).

Raf et MEK ont été liées à la progression et à la promotion de la croissance du cancer (Shields *et al.*, 2000). L'importance de la voie ERK dans l'oncogenèse a été suggérée par l'identification initiale de Raf comme un oncogène rétroviral puissant (Schreck et Rapp, 2006). Des études utilisant des approches génétiques et pharmacologiques ont montré que MEK et ERK sont nécessaires pour les activités de transformation de Ras et d'autres oncogènes. De plus, l'activité mutationnelle de Raf a été identifiée dans une variété de cancers humains (Davies *et al.*, 2002) incluant des mélanomes, des carcinomes colorectaux, les carcinomes papillaires thyroïdiens, les carcinomes ovariens séreux et les cancers du poumon (Roberts et Der, 2007). La signalisation d'ERK a été impliquée dans la facilitation de l'invasion cellulaire de glioblastome déclenchée par la fixation des cellules à la matrice extracellulaire (Park *et al.*, 2008).

Deux isoformes majeures d'ERK, p44 (ERK1) et p42 (ERK2) ont été identifiés et ont suscité l'intérêt de la recherche en raison de leur participation critique dans la régulation de la prolifération et de la survie cellulaire (Benson *et al.*, 2006). Une fois activé, le dimère ERK se dirige vers le noyau afin de phosphoryler et activer différents facteurs transcriptionnels (Peyssonnaud C et Eychène, 2001), tels que Elk-1, CREB, Fos et Gata-1 et d'autres, en se liant au promoteurs de liaison de nombreux gènes, y compris le facteur de croissance et des gènes de cytokines qui sont importants dans la promotion de la



croissance et de la prévention de l'apoptose de plusieurs types de cellules. Dans certaines circonstances, la régulation aberrante de cette voie peut contribuer à la prolifération cellulaire anormale qui peut conduire à de nombreuses anomalies, dont la transformation autocrine, la résistance aux médicaments, la sénescence ou le vieillissement prématuré (Steelman *et al.*, 2011).

La voie ERK régule l'activité de nombreuses protéines impliquées dans l'apoptose. ERK phosphoryle également des facteurs de transcription qui influencent la transcription de la famille de gènes Bcl-2 ainsi que d'autres gènes importants impliqués dans la régulation de l'apoptose. La majorité des effets de la voie ERK sur l'apoptose sont médiés par la phosphorylation d'ERK par des molécules effectrices apoptotiques clés (par exemple, la protéine Bcl-2, Mcl-1, Bad, Bim, CREB, Foxo, Caspase-9 et bien d'autres) (Steelman *et al.*, 2011). En particulier, l'activation et/ou la surexpression des mutations de composants en amont de la signalisation de la voie ERK, ainsi que les nombreuses observations expérimentales, démontrent la nécessité de cette voie dans la fonction des oncogènes (Benson *et al.*, 2006). Les observations génétiques et expérimentales fournissent des validations que des inhibiteurs de la cascade d'ERK procurent des agents antinéoplasiques efficaces pour le traitement d'une gamme des cancers humains, incluant ceux où les drogues actuelles sont malheureusement inefficaces (Roberts et Der, 2007).

#### 1.3.1.2 La voie JNK

Les protéines JNKs appartenant à une famille de kinases sont impliquées dans la réponse au stress cellulaire, l'apoptose et la transformation maligne (Davis, 2000). Elles modulent un large spectre de voies de signalisation intracellulaires qui convergent à réguler à la fois l'expression des gènes et l'homéostasie des macromolécules, y compris des ARN messagers et des protéines (Bogoyevitch et Kobe, 2006). La protéine activée par le stress, JNK, est régulée par une variété de MAPKKs, dont la MEKK1/4 et la kinase reliée aux signaux d'apoptose (ASK1), qui est, en outre, régulée par des GTPases et Rac1. Les protéines kinases JNK sont codées par trois gènes, JNK-1, JNK-2 et JNK-3. Les gènes JNK-1 et JNK-2 sont exprimés de façon ubiquitaire. Le gène JNK-3 a un modèle plus limité d'expression et se limite essentiellement au cerveau, au cœur et aux testicules. Ces trois gènes de JNK sont susceptibles à l'épissage alternatif, ce qui entraîne plus de 10 isoformes de JNK (Davis, 2000).



La cascade JNK est fortement activée par l'exposition des cellules au stress environnemental tel que les UV et des radiations  $\gamma$ , le stress oxydatif et les cytokines inflammatoires. Le mécanisme d'activation de la voie JNK est engendré par la double phosphorylation au sein du motif Thr138-Pro-Tyr-185 (pTPpY) du noyau catalytique. Cette phosphorylation est modulée par les kinases MKK4 et MKK7. Ces kinases intègrent un large éventail de stimuli dans l'activation de la voie de signalisation JNK (Junttila *et al.*, 2007).

La cascade de signalisation est composée d'un MAPKKK, typiquement MEKK1-4, qui phosphoryle et active la MKK4-7 qui, à son tour, phosphoryle et active JNK. Une autre MAPKKK, l'ASK1, est aussi activée en réponse à une variété de stimuli reliés au stress, y compris le stress oxydatif, qui active à son tour JNK. La surexpression de l'ASK1, une fois qu'elle a induit JNK et p38, stimule l'apoptose via des signaux impliquant la voie de mort cellulaire mitochondriale (Spencer, 2007). Bien que les JNK soient principalement associées à la mort pro-apoptotique des cellules ou à la suppression des tumeurs en réponse à une variété de signaux de stress, inflammatoires ou oncogéniques (Liu et Lin, 2005), des nouvelles preuves suggèrent que les JNK, en particulier JNK-1, jouent un rôle dans la transformation maligne des cellules et dans la tumorigenèse. Dans la tumorigenèse induite par les UV, l'activation de JNK-1 est essentielle pour la transformation et la prolifération cellulaire en réponse au signal de Ras oncogénique (Derijard *et al.*, 1994).

Des recherches antérieures ont rapporté que l'inhibition de JNK-1 par un siRNA, mais pas de JNK-2, a renversé la croissance de cellules tumorales dérivées du tissu mou d'un sarcome pédiatrique. Ceci indique que JNK-1 possède une fonction pro-proliférative, tandis que JNK-2 pourrait être plutôt pro-apoptotique (Durbin, Somers *et al.*, 2009; Durbin, Hannigan *et al.*, 2009). Une des preuves les plus convaincantes attribuée au rôle de JNK-1 dans l'initiation du cancer, a été déduite à partir des études effectuées sur des tissus humains de carcinomes hépatocellulaires (HCC). Deux études indépendantes ont montré que dans plus de 50% des échantillons de HCC, il a été détecté une suractivation de JNK-1, mais non pas de JNK-2 (Hui *et al.*, 2008; Chang, Zhang *et al.*, 2009). De plus, d'autres études ont en outre démontré que l'activité plus élevée de JNK1 est associée à un

mauvais pronostic des patients et à la surexpression de plusieurs marqueurs de cellules souches hépatiques (Chang, Chen *et al.*, 2009).

#### 1.3.1.3 La voie p38

La kinase p38 est représentée par quatre isoformes: p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  et p38 $\delta$ . Les quatre isoformes p38 appartiennent à la famille des MAPKs activées par le stress (Raman *et al.*, 2007). La sous-famille de p38 joue un rôle important dans la production de cytokines et dans la réponse au stress. De plus, les protéines kinases p38 touchent une variété de réponses intracellulaires, avec des rôles bien reconnus dans l'inflammation, la régulation du cycle cellulaire, la mort cellulaire, le développement, la différenciation et la tumorigénèse (Coulthard *et al.*, 2009). La voie de p38 est activée par le stress cellulaire, y compris les radiations UV, le choc thermique, le stress osmotique élevé, les lipopolysaccharides, les inhibiteurs de la synthèse des protéines, les cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-1 et le TNF- $\alpha$ , et certains mitogènes (Mittelstadt *et al.*, 2005).

La kinase p38 peut être phosphorylée par de nombreux stimuli extracellulaires et suit la voie classique de signalisation MAPKK-MAPKK-MAPK. À son état inactif, p38 est non phosphorylé et peut être rapidement activé par une double phosphorylation de la MKK sur la thréonine et la tyrosine, au sein du motif thréonine-glycine-tyrosine (Thr-Gly-Tyr), situé à l'intérieur de la boucle de régulation des sous-domaines d'activation VII et VIII (Raman *et al.*, 2007). La MKK requise pour la phosphorylation de p38 MAPK dépend de la stimulation cellulaire reçue et du type cellulaire. Les MKK3 et MKK6 généralement phosphorylent p38 en quelques minutes après l'exposition aux divers stimuli d'activation. La durée de la phosphorylation est contrôlée par des phosphatases comme la protéine phosphatase 1, la protéine phosphatase 2A ou les phosphatases MAPK. Ces enzymes peuvent être activées par la p38 phosphorylée et propager une boucle de régulation négative de la p38 activée. Le croisement des différentes voies de signalisation affecte également la cinétique de signalisation de p38, et, par conséquent, affecte son effet sur le cible des cellules (Mittelstadt *et al.*, 2005).

Dans plusieurs modèles cellulaires, l'activation de la voie p38 est nécessaire pour l'induction de l'apoptose. De plus, l'activation de p38 par le stress provoque l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 / M et la régulation de celui-ci à travers la modulation des protéines

suppresseurs de tumeurs, p53 et p73 (Bulavin *et al.*, 2001; Bulavin *et al.*, 2004). Il a été rapporté que l'activation de la voie p38 incite la croissance et la survie des cellules cancéreuses. De plus, l'activité de la p38 a été corrélée au caractère invasif de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses, et son inhibition réduit la prolifération, la survie et l'invasion de ces cellules (Johansson *et al.*, 2000; Junttila *et al.*, 2007). Les mécanismes moléculaires par lesquelles la signalisation de p38 favorise ou inhibe la prolifération et la survie cellulaire n'ont pas encore été élucidés. Il est postulé que cela pourrait être lié à l'état de transformation de la cellule ou à la nature des signaux d'activation de p38 (Junttila *et al.*, 2008).

### 1.3.2 La voie PI3K/AKT

La voie de signalisation PI3K-AKT régule de nombreux processus cellulaires normaux, dont la prolifération cellulaire, la survie, la croissance et la motilité, tous des processus qui sont essentiels pour la tumorigenèse (Vivanco et Sawyer, 2002). La voie PI3K-AKT, en parallèle avec la voie de signalisation Ras / MAPK, contribue à la régulation de la progression du cycle cellulaire, en particulier lors de la transition entre les phases G1 / S (Luo *et al.*, 2003). Depuis sa découverte initiale comme proto-oncogène, la protéine sérine / thréonine kinase AKT (aussi appelée protéine kinase B ou PKB) est devenue une préoccupation majeure pour les chercheurs en raison de son rôle de régulateur crucial dans divers processus cellulaires, dont la progression du cancer. La cascade de l'AKT est activée par des récepteurs tyrosine kinases, des intégrines, des récepteurs de cellules B et T, des récepteurs de cytokines, des récepteurs couplés aux protéines G et d'autres stimuli qui induisent la production de phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphates (PtdIns (3,4,5) P3) (Carnero *et al.*, 2008).

Le phosphoinositide 3-kinase (PI3K) est un élément important de signalisation en aval des récepteurs tyrosine kinase (RTKs) (Cantley, 2002). Le PI3K catalyse la production du second messager lipidique phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) au niveau de la membrane cellulaire. Le PIP3, à son tour, contribue au recrutement et à l'activation d'un large éventail de cibles en aval, y compris la PKB. Au niveau de la membrane, le PI3K phosphoryle le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) à la position 3' sur son cycle inositol et converti le PIP2 en PIP3. Par la suite, PIP3 recrute d'autres molécules en aval, en particulier la sérine-thréonine kinase AKT et PDK1- via une

liaison à leur domaine (PH). Mentionnons qu'il existe trois isoformes d'AKT fortement reliées l'une à l'autre (AKT1, AKT2 et AKT3) et qui représentent le bras majeur de la signalisation du PI3K (Salmena *et al.*, 2008). Lorsque la protéine AKT est liée à la membrane cellulaire, elle est partiellement activée par la phosphorylation de la thréonine 308 par la PDK1. Une phosphorylation supplémentaire de la sérine 473 à l'extrémité C-terminale de AKT résulte en son activation complète (Ozes *et al.*, 1999; Romashkova *et Makarov*, 1999). AKT régule à son tour une large gamme de protéines cibles qui contrôle diverses processus tels que la prolifération cellulaire, la croissance, le métabolisme et l'absorption du glucose (Cantley et Neel, 1999).

AKT est un médiateur important de la survie des cellules par l'inhibition directe de signaux pro-apoptotiques tels que le régulateur pro-apoptotique BAD, Foxo et la famille des facteurs de transcription Myc (Salmena *et al.*, 2008). De plus, AKT régule l'activation indirecte du facteur de transcription pro-survie NF- $\kappa$ B et la phosphorylation de la kinase I $\kappa$ B (IKK), ce qui conduit à une augmentation de la transcription des gènes anti-apoptotiques (Ozes *et al.*, 1999; Romashkova et Makarov, 1999). La voie AKT contribue également à des processus cellulaires caractéristiques du cancer (Hanahan et Weinberg, 2000). Par exemple, le VEGF présente des activités biologiques multiples dans les cellules endothéliales, et des effets sur la survie des cellules ont été démontrés d'être médiés par la voie Flk1/VEGFR2-PI3K-AKT (Shiojima et Walsh, 2002). La migration des cellules tumorales est en partie liée à la voie d'AKT (Lefranc *et al.*, 2005). Il a été montré qu'AKT contribue également à l'invasion tumorale et à la métastase en favorisant la sécrétion de métalloprotéinases matricielles (Thant *et al.*, 2000) et l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). De plus, il a été rapporté qu'au niveau d'autres processus cellulaires, AKT phosphoryle la télomérase, enzyme responsable de la réplication (Liu, 1999). Des études récentes suggèrent qu'un environnement pro-inflammatoire active la voie AKT dans le cancer du sein, et ceci peut modifier l'association entre le statut de phosphorylation d'AKT et la survie des cellules cancéreuses (Prueitt *et al.*, 2007).

### 1.3.3 Mécanismes cellulaires

#### 1.3.3.1 L'apoptose



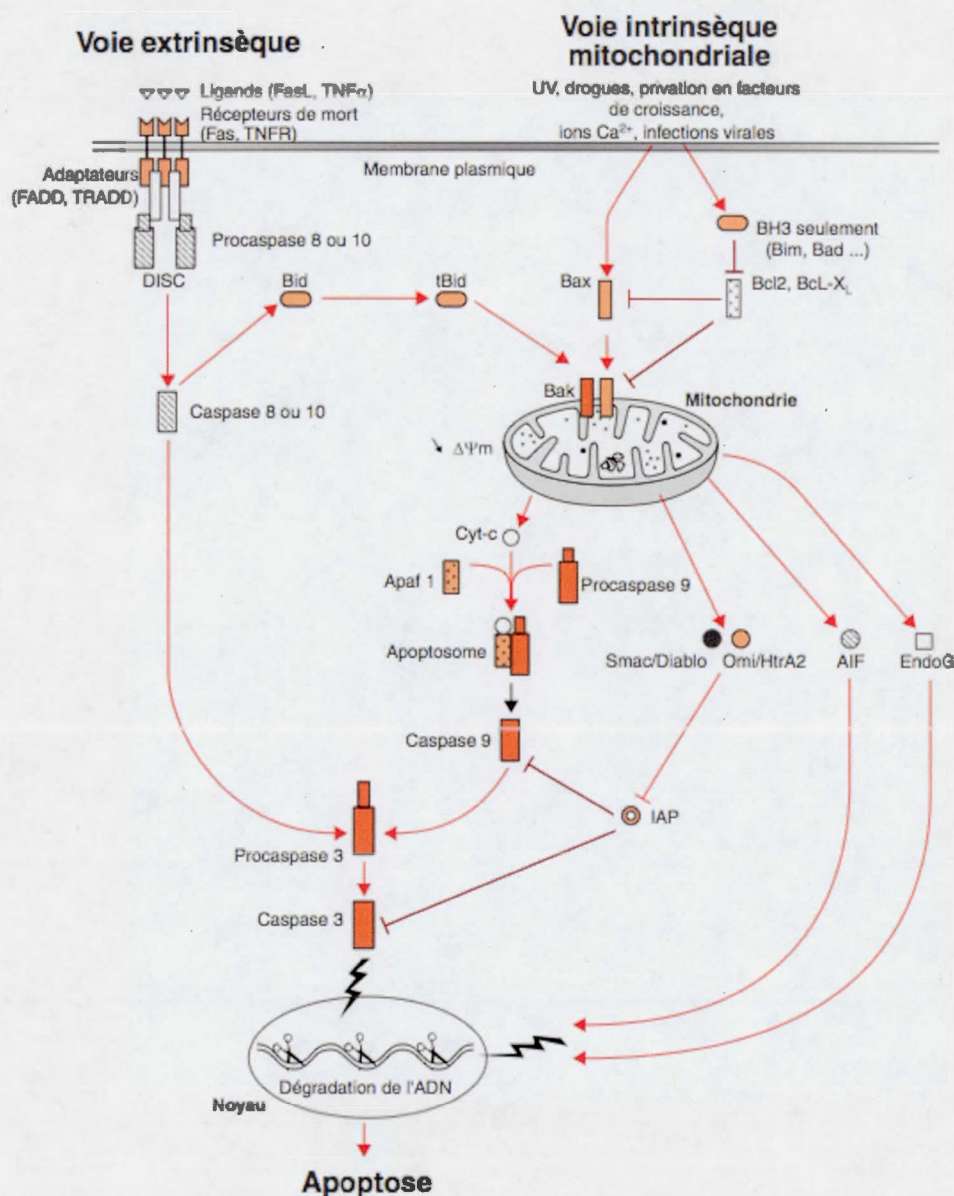
Dans des conditions physiologiques normales, le corps humain maintient l'homéostasie en éliminant les cellules non désirées, endommagées, ou vieilles. L'homéostasie est effectuée d'une manière programmée génétiquement par un processus appelé apoptose, une mort cellulaire programmée. L'apoptose intervient aussi comme un mécanisme de défense, tel que dans la régulation de la réponse immunitaire et la suppression de cellules du système immunitaire à reconnaître des antigènes du soi (Ekert et Vaux, 1997). Les cellules cancéreuses sont capables d'échapper à l'apoptose et de croître d'une manière rapide et incontrôlée (Green, 2000).

L'apoptose représente seulement une des formes de mort cellulaire. Les cellules peuvent être éliminées par un certain nombre de mécanismes alternatifs, dont la nécrose. La nécrose est typiquement décrite comme une forme "non spécifique" de la mort cellulaire, caractérisée par la rupture de la membrane plasmique d'une réaction inflammatoire localisée et par conséquent l'endommagement des cellules et des tissus voisins (Kroemer *et al.*, 1998). Au contraire, l'apoptose est associée à la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN, et à la phagocytose rapide suite à la rupture de la membrane plasmique. Cette étape est suivie de l'élimination des débris cellulaires par des cellules phagocytaires qui reconnaissent des signaux affichés sur la surface extérieure de la cellule apoptotique (Henson *et al.*, 2001). En d'autres mots, la mort cellulaire par apoptose est la conséquence d'une série d'événements réglementés précisément, et qui sont fréquemment modifiés dans les cellules tumorales. Cela suggère la possibilité d'une intervention clinique sélective pour provoquer la mort de la cellule tumorale sans endommager les cellules normales (Kasibhatla et Tseng, 2003).

Un ensemble complexe de protéines, y compris les caspases, la famille de protéines de cellules lymphocytes B (Bcl)-2 pro-apoptotiques et antiapoptotiques, le cytochrome c et le facteur d'activation de la protéase apoptotique (Apaf)-1, exécute l'apoptose, soit par une voie intrinsèque soit par une voie extrinsèque. La voie intrinsèque est dépendante des mitochondries alors que la voie extrinsèque est déclenchée par les récepteurs de mort (DRS) (figure 8) (Gupta, Kim *et al.*, 2010).

La dérégulation des voies apoptotiques engendre un certain nombre des maladies humaines telles que le cancer, le SIDA, les maladies dégénératives et auto-immunes et les maladies infectieuses (Kuwano et Hara, 2000). L'idée que l'apoptose puisse influencer sur le

phénotype malin remonte au début des années 1970 (Lowe et Lin, 2000). Des études subséquentes ont révélé une fréquence élevée de l'apoptose dans les tumeurs en régression spontanée et dans les tumeurs traitées avec des agents anticancéreux cytotoxiques (Kett *et al.*, 1994). Ensemble, ces observations ont suggéré que l'apoptose contribue au taux élevé de perte de cellules dans les tumeurs malignes et, par ailleurs, pourrait favoriser la progression de la tumeur (figure 8). Cependant, l'importance de l'apoptose dans le cancer est restée sous-estimée depuis plus de 15 ans (Lowe et Lin, 2000).



**Figure 8. Les voies extrinsèques et intrinsèques de l'apoptose.** La voie extrinsèque, ou voie des récepteurs de mort, est activée une fois la fixation de ligands FasL et TNF $\alpha$  sur le récepteur, afin de former le complexe DISC. Ce complexe déclenche l'activation des procaspases initiatrices 8 et 10. La voie intrinsèque ou voie mitochondriale est induite par des facteurs de stress spécifiques, par exemple, certaines infections virales, et se poursuit avec la libération du cytochrome c (Cyt-c) dans le cytosol. Cette voie active la caspase 9 à partir de la procaspase. Les caspases 3 et 9 sont médiées par les IAP. La voie mitochondriale est finement régulée par les protéines de la famille de Bcl2. Les deux voies se chevauchent au niveau de l'activation de la procaspase 3 en caspase 3 effectrice, responsable de l'activation d'enzymes qui induisent le clivage nucléotidique. [Adaptée de Blondel *et al.*, 2006]

### 1.3.3.2 La caspase 3

Les caspases sont des protéines faisant partie d'une famille de cystéines protéases de 14 membres. Elles sont synthétisées sous forme de zymogènes inactifs qui doivent se soumettre à un clivage protéolytique au niveau des résidus aspartates pour générer l'enzyme mature active (Ahmad *et al.*, 1998). Ces événements de clivage suppriment le peptide NH<sub>2</sub>-terminal et séparent les petites et grandes sous-unités de la pro-enzyme pour générer une caspase hétérotétramérique mature composée de deux grandes et de deux petites sous-unités. La génération des caspases activées forme une cascade d'évènements, dans laquelle les caspases "initiatrices" interagissent avec des molécules adaptatrices spécifiques afin de faciliter leur action (Kasibhatla et Tseng, 2003). Chaque voie active sa propre caspase initiatrice (caspases 8, 9, 10) qui, à son tour, active la caspase-3 effectrice (Elmore, 2007). Ces caspases initiatrices, une fois activées, vont cliver et activer à leur tour les caspases effectrices en aval, ce qui initie la phase d'apoptose (Hu *et al.*, 1998; Stennicke et Salvesen, 2000; Nicholson, 1999). Ces caspases d'exécution activent les endonucléases cytoplasmiques qui dégradent les protéines nucléaires et celles du cytosquelette. Le point final des deux voies extrinsèques et intrinsèques se croise à un point d'exécution commun, considéré comme la voie finale de l'apoptose (Elmore, 2007).

La caspase-3 est considérée la plus importante des caspases effectrices et est activée par l'une des caspases initiatrices (caspase-8, caspase-9, ou caspase-10). Elle active spécifiquement l'endonucléase et dans les cellules apoptotiques, elle clive Cisd pour libérer CAD (Sakahira *et al.*, 1998). CAD dégrade ensuite l'ADN chromosomique dans le noyau et provoque la condensation de la chromatine. La caspase-3 induit également la réorganisation du cytosquelette et la désintégration de la cellule en corps apoptotiques.



Une protéine de liaison de l'actine, nommée Gelsolin, a été identifiée comme l'un des principaux substrats de la caspase-3 (Kothakota *et al.*, 1997).

#### 1.3.3.3 La survivine

La survivine est une protéine de 16.5 kDa appartenant à la famille des inhibiteurs de protéines d'apoptose (IAP). Cette protéine est fortement exprimée dans la plupart des cancers et joue un rôle dans la régulation de l'apoptose et du cycle cellulaire. La présence de la survivine dans les cancers est associée à la résistance des cellules cancéreuses à la chimiothérapie et à l'augmentation de récurrence de la tumeur, diminuant ainsi le taux de survie des patients atteints de cancer. L'augmentation de la résistance des tumeurs à divers stimuli apoptotiques est renforcée par la survivine principalement par des mécanismes caspase-dépendants, mais elle peut également agir en bloquant l'apoptose de façon indépendante aux caspases (Altieri, 2003). Toutefois, des preuves croissantes indiquent que la survivine est exprimée aussi dans les cellules normales adultes en particulier dans les cellules hématopoïétiques primitives (les lymphocytes T, les neutrophiles polynucléaires et les cellules endothéliales vasculaires) où elle régule leur prolifération et leur survie (Fukuda et Pelus, 2006).

#### 1.3.3.4 La GRP78

La protéine 78 régulée par le glucose (GRP78, 70 kDa) est un membre de la famille des protéines de choc thermique (HSP). Ces protéines, incluant la GRP78, sont des chaperons moléculaires qui facilitent le repliement correct, le transport et la dégradation des protéines (Quinones *et al.*, 2008). L'apport d'un facteur de stress à la cellule renforce les contraintes par lesquelles la GRP78 est induite rapidement. La GRP78 est surtout connue pour se lier aux « patches » hydrophobes des polypeptides naissants du réticulum endoplasmique et pour son rôle dans la signalisation de la réponse des protéines dépliées. Lorsque le mauvais repliement des protéines devient délétère et irréversible, la GRP78 aide à leur désagrégation (Quinones *et al.*, 2008). De plus, la GRP78 entretient l'homéostasie calcique cytosolique et forme des complexes avec des molécules pro-apoptotiques, telles que les membres de la famille des caspases, réduisant ainsi la mort cellulaire programmée.



La GRP78 est un membre particulier de la famille de HSP qui a une corrélation étroite avec les tumeurs. Dans certains types de tumeurs, la GRP78 agit comme un récepteur ancré à la membrane plasmique, participant à la transduction des signaux associés à la survie et à la prolifération des cellules cancéreuses, et à leur métastase. Il a été observé une surexpression de la GRP78 dans une variété de tumeurs, incluant les tumeurs du système urinaire, digestif, mammaire, respiratoire et cérébral (Zhang et Zhang, 2010). Mentionnons cependant que l'induction de HSP est un élément intégrateur essentiel des réponses physiologiques adaptatives, qui peut être provoquée par des contraintes environnementales. Les HSP existent dans pratiquement tous les organismes vivants afin de les aider à survivre dans des environnements défavorables (Jolly et Morimoto, 2000).

#### 1.4 Alimentation vs cancer

Il y a près de 25 siècles, Hippocrate, le père de la médecine, a proclamé « *Que ta nourriture soit ton médicament et ton médicament ta nourriture* » (Paliyath *et al.*, 2011). La corrélation entre l'alimentation et la santé se poursuit encore aujourd'hui et avec encore plus de sérosité. Des multiples études épidémiologiques et animales ont montré que la consommation d'aliments riches en fruits et en légumes a diminué le risque d'incidence de cancer (Gupta *et al.*, 2010) et que les personnes consommant moins de fruits et légumes ont environ deux fois plus de probabilité de développer certains cancers que ceux ayant une plus forte consommation de ces aliments (Beliveau et Gingras, 2005). En effet, le Fonds Mondiale de Recherche contre le cancer a suggéré qu'une nutrition adéquate pouvait empêcher environ 35% des décès causés par le cancer, et que certains cancers pourraient être évités, jusqu'à 90%, par une amélioration alimentaire (Gupta *et al.*, 2010).

Les plantes médicinales et les composés phytochimiques sont des sources potentielles pour le développement de nouveaux médicaments anti-inflammatoires, anti-angiogéniques et anticancéreux. De nombreuses études ont rapporté l'utilisation de flavonoïdes comme inhibiteur naturel efficace sur l'initiation et la progression du cancer (Weng et Yen, 2012). Les agents alimentaires contenus dans les fruits, légumes et épices ont été largement étudiés pour leurs effets bénéfiques potentiels dans la prévention de diverses maladies humaines. Les polyphénols sont les phytochimiques les plus abondants des agents alimentaires végétaux, possédant divers avantages bénéfiques pour la santé, dont des effets neuroprotecteurs, cardioprotecteurs et chimiopréventifs (Jiang *et al.*, 2010).

Un tiers de l'apport total en polyphénols est représenté par les acides phénoliques, et les deux tiers restants sont des flavonoïdes. Les flavonoïdes sont des substances polyphénoliques largement présentes dans presque toutes les plantes alimentaires. Leur rôle est important dans la défense des cellules des plantes envers les microorganismes, les insectes, et les radiations UV (Harborne et Williams, 2000). Les flavonoïdes possèdent des propriétés antivirales, antimicrobiennes, anti-inflammatoires, antiallergènes, antithrombotiques, antimutagènes, antinéoplasiques et de plus, elles ont aussi des effets cytoprotecteurs sur différents types de cellules. Des études épidémiologiques ont suggéré que la consommation de flavonoïdes peut être associée à une diminution du risque de plusieurs types de cancer (Birt *et al.*, 2001).

Les flavonoïdes constituent le groupe le plus commun de polyphénols végétaux et fournissent une grande partie de la saveur et de la couleur des fruits et des légumes. Plus de 5,000 flavonoïdes différents ont été décrits. Les six principales sous-classes de flavonoïdes comprennent les flavones (apigénine, lutéoline), les flavonols (quercétine, myricétine), flavanones (naringénine, hespéridine), les catéchines ou flavanols (épicatéchine, gallocatéchine), anthocyanidines (cyanidine, pélargonidine), et les isoflavones (génistéine, daidzéine). La plupart des flavonoïdes présents dans les plantes sont attachés à des sucres (glucosides), mais peuvent se trouver sous forme d'aglycones. L'intérêt envers les bénéfices des flavonoïdes sur la santé a augmenté en raison de leur puissante propriété antioxydante et de leur capacité à capter les radicaux libres observés *in vitro* (Ross et Kasum, 2002).

Dans les réponses inflammatoires telles que celles qui sont impliquées dans la pathogenèse de l'athérosclérose, du cancer, de l'arthrite rhumatoïde, de la néphropathie, et du diabète, les neutrophiles produisent des radicaux et libèrent des enzymes lysosomiales telles que la  $\beta$ -glucuronidase. Grâce à la propriété de la  $\beta$ -glucuronidase de pouvoir hydrolyser le glycuronide conjugué de flavonoïdes en libérant de l'aglycone, les flavonoïdes sous forme libre deviennent plus antioxydants. Ils entrent dans les cellules et exercent des effets biologiques directement sur les sites de l'inflammation. Les flavonoïdes peuvent donc jouer un rôle dans la prévention des maladies mentionnées ci-dessus (Shimoi *et al.*, 2001).

Il existe des évidences considérables que les régimes occidentaux riches en féculents raffinés, en sucre, en acides gras saturés, en gras-trans, et pauvres en fruits, légumes, fibres, acides gras oméga-3 et en grains entiers, favorisent l'inflammation (Giugliano *et al.*, 2006). Les cellules inflammatoires et immunitaires de personnes consommant un régime occidental typique contiennent une forte proportion de différents types d'acides gras oméga-6/oméga-3 polyinsaturés pro-inflammatoires, de l'acide arachidonique et de l'acide docosahexaénoïque (DHA) (Calder, 2002). Étant donné que l'acide arachidonique est le précurseur des prostaglandines qui sont des médiateurs hautement actifs de l'inflammation, un rapport diététique à haute teneur en acides gras oméga-6/oméga-3 se traduit donc par la génération d'un état pro-inflammatoire qui peut soutenir la progression de plusieurs pathologies, y compris le cancer (Larsson *et al.*, 2004). Un aspect clé des effets chimiopréventifs de régimes alimentaires contenant des quantités plus élevées d'aliments d'origine végétale et moins de viande et de féculents raffinés pourrait donc être la réduction de l'inflammation. Ceci met en évidence les interactions étroites qui existent entre l'alimentation et le microenvironnement tumoral (Gingras et Béliveau, 2011).

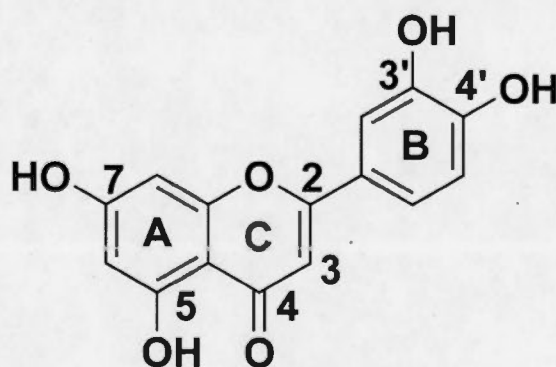
De nombreuses études indiquent qu'une réduction substantielle du nombre de cas de cancers pourrait être atteinte grâce à des modifications apportées aux facteurs alimentaires et au mode de vie occidental. Le potentiel de prévention apporté par ces modestes changements est énorme. Il a été estimé que jusqu'à 70% des cas de cancers du côlon dans la population des États-Unis pourraient être évités avec ces changements (Platz *et al.*, 2000). Attendu que plusieurs facteurs de style de vie et diététiques sont reconnus pour augmenter le risque de plusieurs types de cancers, et le développement d'autres maladies chroniques, des changements à ces facteurs conduiraient à des avantages significatifs sur l'état de santé global de la population (Gingras et Béliveau, 2011).

#### 1.4.1 La lutéoline

Les investigations sur les flavonoïdes accordent encore peu d'importance à la lutéoline. La lutéoline, ou 3',4',5,7-tétrahydroxyflavone, est trouvée habituellement sous sa forme glycosylée dans une variété d'aliments à base de plantes comme le céleri, le persil, le brocoli, les feuilles d'oignon, les carottes, les poivrons, le chou, les pelures de pomme, les fleurs de chrysanthème, l'huile d'olives et encore plus (Lin *et al.*, 2008). Les

concentrations de lutéoline dans les aliments sont généralement faibles par rapport à certains autres flavonols comme la quercétine ou le kaempférol. Les exemples de plantes contenant des quantités plus importantes de lutéoline sont les *Reseda luteola* L., les résédas et aussi les coques d'arachide (Seelinger *et al.*, 2008). La lutéoline a également été isolée à partir de deux plantes d'Asie traditionnellement utilisées en tant que médicaments anticancéreux, *Epimedium koreaonum* et *Terminalia arjuna*, et il a été trouvé à inhiber la prolifération des cellules MCF-7 (cancer du sein) et HepG2 (cancer du foie) d'une manière dose dépendante (Pettit *et al.*, 1996).

Appartenant au groupe flavone des flavonoïdes, la lutéoline a une structure en C6-C3-C6 qui possède deux anneaux de benzène (A, B), un anneau (C) incluant un atome d'oxygène, et une double liaison sur les carbones 2-3 (figure 9). La lutéoline possède aussi des groupes hydroxyles aux atomes de carbone en positions 5, 7, 3' et 4'. Les groupements hydroxyles et la double liaison en C2-3, sont des caractéristiques importantes dans la structure de la lutéoline, qui sont associés à ses activités biochimiques et biologiques. La lutéoline est stable à la chaleur, et les pertes dues à la cuisson sont relativement faibles (Lin *et al.*, 2008).



**Figure 9. La structure moléculaire de la lutéoline.** [Adaptée de Lin *et al.*, 2008]

Les plantes riches en lutéoline ont été utilisées dans la médecine traditionnelle chinoise pour aider à diminuer l'hypertension, les maladies inflammatoires et le cancer. Comme les autres flavonoïdes d'origine végétale, la lutéoline a une variété d'activités biologiques, y compris les propriétés bien connues anti-mutagènes et anti-tumorigènes (Ross et Kasum, 2002). Il a été démontré dans des conditions de laboratoire que ce



composé peut avoir des propriétés anti-inflammatoires, anti-oxydantes et anti-cancéreuses. Une nouvelle recherche publiée dans le revue de *BioMed Central BMC Gastroenterology* a montré que la lutéoline est capable d'inhiber l'activité des voies de signalisation cellulaire IGF et PI3K, connues être importantes pour la croissance de cellules cancéreuses du côlon. D'autres recherches ont montré les effets inhibiteurs de la lutéoline sur l'expression des cytokines pro-inflammatoires dans la microglie. De plus, ce flavonoïde affecte plusieurs voies de signalisation conduisant à un phénotype anti-inflammatoire, anti-oxydant, et à des caractéristiques neuroprotectrices. La lutéoline présente également des activités anti-inflammatoires par l'inhibition du NF- $\kappa$ B dans des cellules immunitaires. Les résultats des recherches publiées suggèrent que la lutéoline pourrait être un candidat prometteur dans le développement de traitements immuno-modulateurs et neuroprotecteurs pour des maladies neurodégénératives (Dirscherl *et al.*, 2010).

27 flavonoïdes provenant d'espèces d'agrumes ont été testés pour leur activité anti-proliférative sur plusieurs cancers et lignées cellulaires humaines normales en utilisant un essai avec le bleu Alamar (un indicateur d'oxydo-réduction). Parmi ces molécules, la lutéoline a montré la plus forte inhibition avec un IC50 de 3,1  $\mu$ M pour les cellules A549 de cancer de poumon humain, 2,3  $\mu$ M pour les cellules murines de mélanomes B16, 2,0  $\mu$ M pour les cellules-T de leucémie humaines CCRF-HSB-2 et 1,3  $\mu$ M pour les cellules de cancer gastrique humain TGBC11TKB (Kawaii *et al.*, 1999). La lutéoline présente également une cytotoxicité sur une variété de cellules cancéreuses en supprimant des voies de survie cellulaire et en stimulant les voies de l'apoptose. Notamment, la lutéoline est perméable à la barrière hémato-encéphalique, la rendant applicable au traitement des maladies du système nerveux central, y compris le cancer du cerveau (Wruck *et al.*, 2007).

## CHAPITRE II

### PROJET DE RECHERCHE

#### 2.1 Problématique

Le glioblastome multiforme est une tumeur du cerveau très maligne avec des options thérapeutiques limitées, une forte récurrence et un taux de mortalité très élevé. Un lien étroit est désormais reconnu entre le développement tumoral et l'inflammation chronique. Cette association est due au fait que les tissus inflammés procurent un environnement idéal pour la prolifération des cellules cancéreuses en leur fournissant plusieurs outils favorisant leur croissance au sein de ces tissus. L'IL-1, une cytokine pro-inflammatoire sécrétée par les monocytes, les macrophages et les tumeurs, joue un rôle majeur dans l'orchestration de l'inflammation. De nombreuses études ont démontré qu'une alimentation riche en fruits et légumes, et donc élevée en flavonoïdes, est inversement associé au développement d'un cancer. Cet effet chimiopréventif est lié à la haute teneur de ces aliments en composés phytochimiques, tels que les polyphénols, qui possèdent des propriétés anticancéreuses et anti-inflammatoires. La lutéoline est un flavonoïde commun qui existe dans de nombreux types de plantes. Les plantes riches en lutéoline ont d'ailleurs été utilisées dans la médecine traditionnelle chinoise pour le traitement de diverses maladies telles que l'hypertension, les troubles inflammatoires, et le cancer. La propriété anti-cancéreuse de la lutéoline est associée à l'induction de l'apoptose et l'inhibition de la prolifération cellulaire, l'angiogenèse et la métastase. Il a déjà été rapporté le potentiel anti-inflammatoire de la lutéoline ainsi que sa capacité à inhiber la biosynthèse des eicosanoïdes, comme les prostaglandines qui sont des produits finaux de la COX-2 et des voies de la lipoxigénase. Ayant des effets biologiques multiples tels que anti-inflammatoires, anti-allergènes et anti-cancéreux, les fonctions de la lutéoline incitent les chercheurs à en connaître plus.

## 2.2 Hypothèses de travail

La lutéoline, un flavonoïde retrouvé dans le poivron, le céleri, le thym et l'huile d'olive, possède des effets anti-inflammatoires et anti-cancéreux qui lui permettraient de moduler l'expression de certaines voies de signalisation et médiateurs pro-inflammatoires dans les cellules cancéreuses. Ainsi, nous émettons l'hypothèse suivante: les activités pharmacologiques de la lutéoline lui octroieraient un certain potentiel dans la prévention ou dans le traitement du cancer du cerveau en inhibant l'expression de médiateurs pro-inflammatoires et modulerait les voies inflammatoires NF-kB/IkB et MAPKs induites par l'IL-1 dans des cellules tumorales U87 issues de glioblastomes.

## 2.3 Objectifs de recherche

Afin d'atteindre nos objectifs, nous tenterons tout d'abord d'évaluer les effets de la lutéoline sur l'expression protéique et génique du médiateur pro-inflammatoire COX-2, induit par l'IL-1 dans les cellules tumorales U87 issues de glioblastomes. Des études ont démontré des quantités accrues de COX-2 dans les tissus précancéreux et cancéreux. De plus, COX-2 est liée à la promotion de la tumorigénèse et à l'inhibition de l'apoptose, de l'angiogenèse et du processus métastatique. Une des voies de signalisation impliquée dans l'activation de la COX-2 est la voie NF-kB. Ainsi, un deuxième objectif serait de déterminer l'effet de la lutéoline sur la voie NF-kB/IkB impliquée dans la régulation transcriptionnelle de facteurs favorisant le microenvironnement inflammatoire tumoral, incluant la COX-2.

Les principales voies reliées à l'inflammation sont les voies de MAPKs : ERK, JNK et p38. Ces voies jouent un rôle dans la survie, la prolifération, l'invasion, l'angiogenèse et la métastase des cellules cancéreuses et sont activées par l'IL-1. Donc, le dernier objectif explorera les effets de la lutéoline sur les protéines impliquées dans les diverses voies de signalisation cellulaires (ERK, AKT, JNK, P38) dans le cancer. Nous avons enfin par la suite évalué l'effet anti-apoptotique de la lutéoline sur les cellules tumorales U87.

### CHAPITRE III

## INVOLVEMENT OF NUCLEAR FACTOR-kB IN THE BIPHASIC EFFECTS OF LUTEOLIN ON CYCLOOXYGENASE-2 INDUCTION BY INTERLEUKIN- 1 $\beta$ IN GLIOBLASTOMA CELLS

Contributions des co-auteurs :

Moldovan : Expérimentation et essais biologiques, analyse des résultats, montage des figures, rédaction du manuscrit.

Lamy : Analyse des résultats, montage des figures, rédaction du manuscrit et conception du projet.

Ben Saad : Expérimentation, analyse des résultats.

Annabi : Analyse des résultats, rédaction du manuscrit, financement et conception du projet.



INVOLVEMENT OF NUCLEAR FACTOR-kB IN THE BIPHASIC EFFECTS  
OF LUTEOLIN ON CYCLOOXYGENASE-2 INDUCTION BY INTERLEUKIN-  
1 $\beta$  IN GLIOBLASTOMA CELLS

Paula Liana Moldovan<sup>§</sup>, Sylvie Lamy<sup>§</sup>, Aroua Ben Saad and Borhane Annabi

**Authors' Affiliation:** Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Centre de Recherche BioMED, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3P8

**Running title:** Biphasic effects of luteolin on glioblastoma cells

<sup>§</sup>**These authors contributed equally to this work**

**Address for correspondence :** Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8.

**Abstract:** 266 words

**Text (include figure legends):** 5283 words

**References:** 48

**Figures:** 6

### 3.1 Abstract

**Background:** Glioblastoma patients still have a very poor prognosis and this requires complementary cancer therapy approaches to be developed. Given that an important inflammatory microenvironment has been associated with solid tumors, development of anti-inflammatory targeting strategies may be envisioned to prevent glioblastoma initiation or progression. Consumption of foods from plant origin is associated with reduced risk of developing cancers, a chemopreventive effect that is, in part, attributed to their high content in phytochemicals with potent anti-inflammatory properties. We explored whether luteolin, a common flavonoid in many types of plants, may exert any anti-interleukin (IL)-1 $\beta$  on the induction of the inflammation biomarker cyclooxygenase (COX)-2.

**Results:** We found that IL-1 $\beta$  effectively triggered COX-2 in U-87 glioblastoma cells, but that luteolin further synergized that induction in a biphasic manner. Such effect of luteolin was not observed when COX-2 expression was induced by the phorbol ester PMA, suggesting that some downstream receptor-mediated signaling was involved. Luteolin pretreatment of cells dose-dependently inhibited IL-1 $\beta$  phosphorylation of inhibitor of  $\kappa$ B, nuclear transcription factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) p65, extracellular signal-regulated kinase-1/2, and c-Jun amino-terminal kinase. Luteolin was also able to inhibit AKT phosphorylation and survivin expression while it triggered both caspase-3 cleavage and glucose-regulated protein 78 expression. These effects were potentiated in the presence of IL-1 $\beta$ . Moreover, luteolin was able to reduce IL-1 receptor gene expression, while treatment with the IL-1 receptor agonist or gene silencing of the IL-1 receptor only partially inhibited IL-1 $\beta$ /luteolin-induced COX-2 expression.

**Conclusion:** These results suggest that increased nuclear translocation of NF- $\kappa$ B p65 is a novel mechanism of action for luteolin, which may contribute to the chemopreventive properties of this diet-derived molecule.

**Keywords:** COX-2; Inflammation; Interleukin-1; Luteolin; NF- $\kappa$ B; Glioblastoma cells

### 3.2 Background

Glioblastoma multiforme is a highly malignant primary brain tumor and represents the most common glioma, which is associated with a poor survival rate (Juratli *et al.*, 2013). This glioma is known for its invasiveness and high resistance to standard treatments of chemotherapy and radiotherapy (Eramo *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2007). The tumor microenvironment regulates glioblastoma development and progression and, among the pool of inflammatory cytokines, elevated levels of interleukin (IL)-1 $\beta$  contribute to glioblastoma cells proliferation and invasion (Solinas *et al.*, 2007; Taniura *et al.*, 2008). Thus, blocking the pro-inflammatory activity of IL-1 $\beta$  could be important in controlling the invasiveness of glioblastoma cells.

Cyclooxygenases (COXs) catalyze the synthesis of prostaglandins from arachidonic acid and have three isoforms including the constitutive isoform COX-1, the inducible isoform COX-2 and a splice variant COX-3 (Sobolewski *et al.*, 2010). COX-2, which is regulated by various growth factors and different cytokines such as IL-1 $\beta$  (Williams *et al.*, 1999), COX-2 is a crucial target for the control of tumors associated with chronic inflammation (Ricciotti and FitzGerald, 2011). Increased COX-2 was detected in a variety of human malignant tumors including glioblastomas, in which its expression correlated with the histopathological grade of gliomas O (Joki *et al.*, 2000). Indeed, high levels of COX-2 have been correlated with higher proliferation rates and shorter survival times than low COX-2 levels (Prayson *et al.*, 2002). There is therefore clear evidence of the positive effects of COX-2 inhibitors, including nonsteroidal anti-inflammatory drugs, against a variety of tumors (Chun and Surh, 2004).

The nuclear transcription factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) is one of the major transcription factors associated with cancer development (Naugler and Karin, 2008). In response to different stimuli, mainly cytokines, glioblastoma cells exhibit elevated levels of NF- $\kappa$ B activity, which contributes significantly to tumor progression (Nogueira *et al.*, 2011). Moreover, it was reported that NF- $\kappa$ B activation is a crucial step in the induction of COX-2 in the brain in response to IL-1 $\beta$  ( Nadjjar *et al.*, 2003). Binding of IL-1 $\beta$  to its type 1 receptor (IL-1R1) activates a cascade of phosphorylation that results in NF- $\kappa$ B activation (Nadjar *et al.*, 2005). NF- $\kappa$ B is a protein complex consisting of a 65-kDa DNA binding subunit (*Rel A*)

and an associated 50-kDa protein (NF- $\kappa$ B1), maintained in the cytoplasm in an inactive state by a protein complex called inhibitor of  $\kappa$ B (I $\kappa$ B) (Perkins, 2012). Once phosphorylated by the I $\kappa$ B kinases (IKKs), I $\kappa$ B then allows p65 and p50 subunits to translocate to the nucleus and to bind to the  $\kappa$ B recognition sites in the promoter regions of various NF- $\kappa$ B-regulated genes such as COX-2 (Zhu *et al.*, 2011): Deregulation of the NF- $\kappa$ B signaling pathway contributes to enhanced glioblastoma cell survival, proliferation, cell cycle progression and chemoresistance, and therefore represents an attractive therapeutic target (Wang *et al.*, 1999; Nagai *et al.*, 2002; Ansari *et al.*, 2001).

Numerous studies have linked abundant consumption of foods from plant origin with decreased risk of developing various cancers (Wiseman, 2008), a chemopreventive effect that is related to the high content of several phytochemicals with potent anticancer and anti-inflammatory properties (Surh, 2003). Among these, luteolin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone), a flavonoid found at high levels in common fruits, vegetables and herbs such as green peppers, parsley, celery, thyme, broccoli, cabbages, and chamomile tea (Lin *et al.*, 2008; Amin *et al.*, 2009), possesses a variety of neuroprotective effects (Dajas *et al.*, 2013), anticancer (Lin *et al.*, 2008) and anti-inflammatory (Seelinger *et al.*, 2008) properties. In this respect, luteolin was demonstrated to antagonize phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-induced COX-2 in human brain endothelial cells (Tahanian *et al.*, 2011), and to inhibit tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ -induced COX-2 expression by down-regulating the transactivation of NF- $\kappa$ B and activator protein-1 (AP-1) in JB6 mouse epidermis cells (Kim *et al.*, 2011). However, the effect of luteolin on the pro-inflammatory cytokine IL-1 $\beta$ -mediated induction of COX-2 has never been investigated. Here, we report for the first time anti-IL-1 $\beta$  effects of luteolin on the NF- $\kappa$ B-mediated transcriptional regulation of COX-2 expression in U-87 glioblastoma cells.



### 3.3 Results

#### **Biphasic effects of luteolin on IL-1 $\beta$ -induced COX-2 gene and protein expression in human glioblastoma cells**

Since modulations in COX-2 expression control brain tumor development within chronic inflammation (Ricciotti and FitzGerald, 2011; Joki *et al.*, 2000), we first examined the effect of luteolin on IL-1 $\beta$ -induced COX-2 expression. U-87 MG cells were serum-starved in the presence of 50 ng/mL IL-1 $\beta$  and various concentrations of luteolin for 24 h. Under these conditions, IL-1 $\beta$  alone caused a marked increase in COX-2 protein expression in U-87 MG (Figure 1A). This induction was potentiated by luteolin treatment at concentrations ranging between 1 – 15  $\mu$ M and decreased at higher concentrations (20 – 50  $\mu$ M) (Figure 1A). The results show that the peak of synergistic IL-1 $\beta$ /luteolin stimulation of COX-2 expression was reached at 15  $\mu$ M, but was completely inhibited at 25  $\mu$ M (Figure 1B). The biphasic effect of luteolin on IL-1 $\beta$ -induced COX-2 protein expression was also observed at the transcriptional level (Figure 1C). Such biphasic effect of luteolin was not observed when COX-2 expression was induced with the tumor-promoting agent PMA, where a concentration-dependent inhibition of COX-2 protein expression was observed (Figure 1D). Thus, this result suggests that downstream IL-1 $\beta$  receptor-mediated signaling was involved.

#### **Luteolin inhibits IL-1 $\beta$ -induced downstream signaling events in human glioblastoma cells**

We next evaluated the effect of luteolin treatment on IL-1 $\beta$ -induced activation of NF- $\kappa$ B and MAPKs signaling pathways known to up-regulate COX-2 expression (Nadjar *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2003). U-87 MG cells were pre-treated for 24 h with different concentrations of luteolin in serum-free medium, and then stimulated with 50 ng/mL IL-1 $\beta$  for 5 min. Protein expression and phosphorylation status of downstream signaling intermediates targeted by luteolin were assessed by immunoblotting using specific antibodies. Pre-treatment with luteolin resulted in a concentration-dependent inhibition of IL-1 $\beta$ -induced phosphorylation of I $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B p65, extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (ERK) and c-Jun amino-terminal kinase (JNK) with a half-maximal inhibition (IC<sub>50</sub>)

of 21.2  $\mu\text{M}$ , 27.7  $\mu\text{M}$ , 11.1  $\mu\text{M}$  and 0.7  $\mu\text{M}$ , respectively (Figure 2A-D). Interestingly, the  $\text{IC}_{50}$  values obtained for the inhibition of MAPK signaling pathways by luteolin were low comparatively to those obtained for NF- $\kappa\text{B}$ , suggesting that MAPK cascade may be predominantly involved in the synergistic IL-1 $\beta$ /luteolin effects on COX-2 expression, while NF- $\kappa\text{B}$  signaling may possibly be involved in the inhibition of IL-1 $\beta$ -induced COX-2 at higher luteolin concentrations.

### **Effect of luteolin on human glioblastoma cells viability**

In order to test whether the anti-IL-1 $\beta$  inhibitory effects of luteolin observed at higher concentrations (>20  $\mu\text{M}$ ) was due to cytotoxicity, we next assessed the effect of this compound on IL-1 $\beta$ -induced death/survival signaling pathways. U-87 MG cells were treated with various concentrations of luteolin in serum-free medium for 24 h, and then stimulated with 50 ng/mL IL-1 $\beta$  for 5 min. Luteolin caused a concentration-dependent inhibition of the phosphorylation of AKT ranged from 1 – 25  $\mu\text{M}$ , while its unphosphorylated form was not altered by treatment (Figure 3A). These effects were observed in the basal conditions and were significantly potentiated in the presence of IL-1 $\beta$  with respective  $\text{IC}_{50}$  values of 1.8  $\mu\text{M}$  and 0.6  $\mu\text{M}$ . To assess whether luteolin mediates and/or inhibits glucose-regulated protein 78 (GRP78), survivin and caspase-3 protein levels, U-87 MG cells were serum-starved in the presence of 50 ng/mL IL-1 $\beta$  and various concentrations of luteolin for 24 h. Under these conditions, luteolin was also able to inhibit survivin expression while it triggered both caspase-3 cleavage and GRP78 expression. Again, these effects were potentiated in the presence of IL-1 $\beta$ , indicating that all of these responses are possibly triggered through IL-1R1-mediated signaling. In order to strengthen these results, we measured the enzymatic activation of caspase-3 in these same condition treatments. Luteolin was found to induce caspase-3 activity in a concentration-dependent manner indicating that apoptosis signaling was involved (Figure 3B). In contrast, the release of LDH in the culture media of U-87 MG cells indicated that luteolin did not induce cell death in the presence of IL-1 $\beta$  compared to control cells after 24 h of treatment. Furthermore, statistical analysis confirmed that the two curves at lower concentrations have similar effects on the induction of caspase-3 activity; however, starting at 15  $\mu\text{M}$  luteolin, the IL-1 $\beta$  began to behave differently from IL-1 $\beta$ -untreated cells suggesting that, at this concentration, IL-1 $\beta$  potentiated the action of luteolin.

## **IL-1 receptor-mediated events are required in the inhibition of IL-1 $\beta$ -induced COX-2 expression**

To elucidate the mechanism underlying the synergistic luteolin/IL-1 $\beta$ -induction of COX-2, we next explored whether any IL-1R1-mediated events were involved. IL-1R1 blockade was performed with the use of another member of the IL-1 family, the antagonist IL-1Ra. U-87 MG cells were serum-starved in the presence of 50 ng/mL IL-1 $\beta$  containing (or lacking) 15  $\mu$ M of luteolin or 500 ng/mL IL-1Ra for 24 h. While no effect was exerted by IL-1Ra itself on COX-2 under these conditions, it significantly reduced luteolin/IL-1 $\beta$ -induction of COX-2 protein expression (Figure 4A, *upper panel*) and completely prevented COX-2 gene expression (Figure 4A, *lower panel*). Requirement of IL-1R1 was confirmed through gene silencing strategies showing that neither IL-1 $\beta$  alone nor combined luteolin/IL-1 $\beta$  were able to trigger COX-2 (Figure 4B). Interestingly, while effective silencing of the IL-1R1 also significantly reduced COX-2 gene expression in luteolin/IL-1 $\beta$ -treated cells (Figure 4C, *lower panel*), we observed that luteolin itself was able to reduce IL-1R1 gene expression (Figure 4C). This suggests that part of the synergistic luteolin/IL-1 $\beta$ -mediated effects require IL-1R1 as well as IL-1R1-mediated downstream signaling in the regulation of COX-2 transcription.

## **NF- $\kappa$ B p65, but not of NF- $\kappa$ B p50, abrogates IL-1 $\beta$ -mediated induction of COX-2 expression**

Among the nuclear factors that regulate COX-2 transcription, we tested which of the NF- $\kappa$ B p50 or NF- $\kappa$ B p65 transcription factors was involved in the synergistic luteolin/IL-1 $\beta$ -induction of COX-2. Gene silencing was performed in U-87 MG cells and specificity of knockdown validated (Figure 5A). While IL-1 $\beta$  or luteolin/IL-1 $\beta$  triggered COX-2 expression in control (siScrambled) conditions, COX-2 was completely abrogated only in those cells in which NF- $\kappa$ B p65 gene expression was specifically downregulated (Figure 5B). Such involvement of NF- $\kappa$ B p65 was further confirmed at the transcriptional level of COX-2, where its absence completely prevented the synergistic action of luteolin/IL-1 $\beta$  on COX-2 (Figure 5C).

### **Luteolin potentiates IL-1 $\beta$ -mediated NF- $\kappa$ B p65 translocation to the nucleus**

In order to further investigate the role of NF- $\kappa$ B p65 and its possible contribution in the transcriptional control of COX-2 in the nucleus, we pre-treated U-87 MG cells with or without 15  $\mu$ M luteolin, stimulated the cells with IL-1 $\beta$  for up to 15 min, and monitored the expression of NF- $\kappa$ B p65 and of lamin A/C protein expression in the respective nuclear fractions (Figure 6A, *left panel*). While the expression of lamin A/C remained unaffected, that of NF- $\kappa$ B p65 increased in IL-1 $\beta$ -treated cells, but this effect was potentiated at 10-15 minutes when the cells were prior pre-incubated with luteolin (Figure 6A, *right panel*). Confocal microscopy images of immunofluorescence staining of NF- $\kappa$ B (Figure 6B) further confirmed the significantly increased nuclear localisation of NF- $\kappa$ B in luteolin/IL-1 $\beta$ -treated cells (Figure 6C). Altogether, this is the first molecular evidence, which explains how increased COX-2 expression is triggered by low concentrations of luteolin and in luteolin/IL-1 $\beta$ -treated cells.



### 3.4 Discussion

Among the various phytochemicals identified in fruits, vegetables, spices and grains, our current study sheds light further on the anti-inflammatory and potential chemopreventive properties of luteolin (Lin *et al.*, 2008). The molecular basis underlying the anti-inflammatory specificity of action of luteolin is currently supported by the fact that luteolin itself has no capacity to trigger inflammation within normal physiological settings. Our study, therefore, sheds light for the first time that, within pathological inflammatory settings such as those mimicked by the action of PMA or IL-1 $\beta$ , luteolin concentrations higher than 15  $\mu$ M exerted significant inhibition of IL-1 $\beta$ -induced COX-2 expression in U-87 glioblastoma cells. This observation is in good agreement and within the physiologically relevant plasma level of 10-20  $\mu$ M (Kanazawa *et al.*, 2006; Lee-Hilz *et al.*, 2008) and of 14  $\mu$ M after oral gavage with 50  $\mu$ mol/kg of luteolin administration in rats (Shimoi *et al.*, 1998).

Chemopreventive assessment of luteolin has also established this class of diet-derived molecule as a potent signal transduction inhibitor (Lin *et al.*, 2010), and this is supported by our current data, which demonstrate that luteolin inhibited IL-1 $\beta$ -induced phosphorylation of JNK, ERK, I $\kappa$ B, and NF- $\kappa$ B. Interestingly, IC<sub>50</sub> values of luteolin inhibition against IL-1 $\beta$  signaling ranged from 0.7 – 11.1  $\mu$ M for the inhibition of ERK and JNK pathways, while IC<sub>50</sub> values ranged from 21.2 – 27.7  $\mu$ M for I $\kappa$ B and NF- $\kappa$ B signaling. Our study is the first to document below plasma level inhibitory functions of luteolin and differential effect on MAPK vs NF- $\kappa$ B signaling pathways triggered by IL-1 $\beta$ . Intriguingly, among the new findings of our study, we also observed biphasic effect of luteolin on IL-1 $\beta$ -induced COX-2 expression whereas this effect was not observed in the inhibition of pAKT, survivin, or caspase-3 cleavage. As such, low (<20  $\mu$ M) luteolin concentrations clearly potentiated IL-1 $\beta$ -induction of COX-2 expression, while at higher (>15  $\mu$ M) luteolin exerted anti-IL-1 $\beta$  effects. The latter molecular effects may be explained in our study, in part, through the downregulation of IL-1R1, while those of the synergistic IL-1 $\beta$ /luteolin effects at low luteolin concentrations could be consequent to a rapid (less than 10 minutes) increase in NF- $\kappa$ B translocation processes from the cytosol to the nucleus which leads to elevated COX-2 mRNA levels. Interestingly, synergistic induction of GRP78, which plays an essential role in the progression and therapeutic

resistance of many cancers (Li and Lee, 2006), was found to be a cellular response to stress and was monitored at luteolin concentrations between 10 – 20  $\mu$ M. Such increase in GRP78 appeared to correlate with lowered survivin expression. Such events suggest that low luteolin concentrations are efficient to trigger endoplasmic reticulum (ER) stress in inflammatory settings. In accordance, enhanced ER stress was recently shown to restore GRP78 trafficking to the cell surface, thereby sensitizing cancer cells to apoptosis (Burikhanov *et al.*, 2013). In line with this, our data also show that IL-1 $\beta$  alone was inefficient to cleave and induce caspase-3, while cleavage and activation of caspase-3 were significantly potentiated in the presence of luteolin in a concentration-dependent manner (15 – 50  $\mu$ M). The fact that luteolin inhibited AKT phosphorylation in both basal and IL-1 $\beta$  treatment is consistent with a previous report indicating that the inhibition of constitutive AKT activation induced apoptosis in various human pancreatic carcinoma cell lines (Bondar *et al.*, 2002).

The synergistic and biphasic inductions of COX-2 and GRP78 observed in our study seem to be performed through a possible common IL-1 $\beta$ /luteolin responsive mechanism. In fact, such behavior is not unique to luteolin, since Young *et al.* (Young *et al.*, 2007) also reported a biphasic effect for the polyacetylene falcarinol, isolated from carrots, which induced proliferative and apoptotic characteristics in human colon carcinoma cell line at low (<20  $\mu$ M) and high (>10  $\mu$ M) concentrations, respectively. Thus, phytochemicals such as luteolin, also function as either an anti-oxidant or as a pro-oxidant molecule (Lin *et al.*, 2008). Oxidative stress has been involved in various neurological disorders and, in the central nervous system (CNS) (Nazari *et al.*, 2013). It can therefore be envisioned that the chemopreventive properties of luteolin, specifically within inflammatory and oxidative stress settings such as those triggered by IL-1 $\beta$  (this study, (Malaplate-Armand *et al.*, 2000)), take place at low concentrations due its ability to induce a state of oxidative stress as reflected by subsequent induction in COX-2 and GRP78 expressions. Such mechanisms were previously documented where chemopreventive agents induced COX-2 in human colon and pancreatic cancer cell lines (Sun *et al.*, 2009). Induction of oxidative stress by chemopreventive agents in cancer cells was suggested to lead to COX-2 overexpression and to COX-2-independent cell death (Sun *et al.*, 2009). Understanding whether and how luteolin's intracellular redox state regulation activity is involved in its cellular effects will be key to evaluating its overall potential as an anticancer agent. Because oxidative stresses are closely related to mutagenesis and carcinogenesis, luteolin, as an antioxidant, may act

as a chemopreventive agent to protect cells from various forms of oxidant stresses, and also as an anti-inflammatory agent to prevent cancer development.

Very recently, increased plasma levels of surrogate markers of IL-1 $\beta$ -mediated CNS inflammation were found to correlate with fatigue, sleep disturbance, and cognitive difficulties in cancer patients exposed to cytotoxic chemotherapeutic agents (Wood and Weymann, 2013). Interestingly, preclinical work suggests IL-1 $\beta$ -mediated CNS inflammation may cause these cancer treatment-related symptoms by altering hypothalamic and hippocampal functions, which implies that pharmacologic targeting will require access to the brain through the vascular endothelium compartment. Evidence suggests that flavonoids generally can penetrate the blood-brain barrier (BBB) (Youdim *et al.*, 2004; Paulke *et al.*, 2006; de Boer VC *et al.*, 2005; Serra *et al.*, 2012). Indeed, it was recently reported that peripheral administration of luteolin freely penetrates the BBB and enters the brain in a mouse model of Alzheimer's disease (Sawmiller *et al.*, 2014). Thus, it is reasonable to predict that circulating luteolin may have access to the microglial cell compartment and that, although speculative, proper consumption of phytochemicals such as luteolin may possibly help reduce the IL-1 $\beta$ -mediated inflammatory processes and prevent these symptoms to occur in cancer patients.

Our study supports the clear advantages that possess plant-derived compounds in healthcare given that their utilization as food has a long history, and that their use is accepted as safe. The fact that only 5-10% of all cancer cases are due to genetic defects and that the remaining 90-95% are due to environment and lifestyle clearly provides opportunities for preventing cancer (Anand *et al.*, 2008). The possible utilization of plant-derived luteolin-enriched extracts in chemopreventive strategies still requires a better understanding of their molecular mechanisms and targets of action. In conclusion, our study provides evidence of pleiotropic actions of luteolin as a signal transduction inhibitor, an anti-inflammation, and proapoptotic agent, and sheds light on new mechanisms supporting its physiological benefits. Consequently, our findings could help in the promotion of new diet strategies to prevent brain tumor-associated neuroinflammation.

### 3.5 Materials and methods

#### Materials

Luteolin was purchased from Extrasynthese (Lyon, France). Human recombinant IL-1 $\beta$  human recombinant IL-1Ra were obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON). The anti-ERK (K-23) polyclonal antibody was from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA). The monoclonal antibody against GAPDH was from Advanced Immunochemical Inc. (Long Beach, CA). The Alexa Fluor® 488 donkey anti-rabbit IgG antibody was purchased from Invitrogen (Carlsbad, NM). Antibodies for AKT, Bip/GRP78, caspase-3, cleaved-caspase-3, I $\kappa$ B, lamin A/C, NF- $\kappa$ B p65, the stress-activated protein kinase/JNK (SAPK/JNK), survivin, phospho-AKT, phospho-NF- $\kappa$ B p65, phospho-SAPK/JNK polyclonal antibodies and phospho-ERK and phospho-I $\kappa$ B monoclonal antibodies were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). The anti-COX-2 monoclonal antibody was from BD Transduction Laboratories™ (Franklin Lakes, NJ). Anti-mouse and anti-rabbit horseradish peroxidase (HRP)-linked secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA) and enhanced chemiluminescence (ECL) reagents were from Denville Scientific Inc. (Metuchen, NJ). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were from Thermo Scientific (Rockford, IL). All other reagents were from Sigma-Aldrich (Oakville, ON).

#### Cell culture

Human glioblastoma cell lines (U-87 MG) was purchased from the American Tissue Culture Collection (HTB-14™) and maintained in modified Eagle's Minimum Essential Medium (Wisent, 320-036) containing 10% calf serum (HyClone Laboratories, SH30541.03), 1mM sodium pyruvate (Sigma-Aldrich, P2256), 2mM L-glutamine, 100 units/mL penicillin and 100  $\mu$ g/mL streptomycin (Wisent, 450202). Cells were cultured at 37°C under a humidified 95%–5% (v/v) mixture of air and CO<sub>2</sub>. Cells were treated with vehicle (0.1% DMSO) or with luteolin and stimulated with IL-1 $\beta$ .



## Western blot analysis

To study the effect of luteolin on COX-2, caspase-3, cleaved caspase-3 and survivin proteins expression, subconfluent U-87 MG cells were serum-starved in the presence of luteolin containing (or lacking) 50 ng/mL IL-1 $\beta$  for 24 h. To study the effect of these luteolin on I $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B p65, ERK and JNK phosphorylation, IL-1 $\beta$  was added to the cells for 5 min. Cells were then washed once with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) containing 1 mM each of NaF and Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and were incubated in the same medium for 30 min at 4°C. The cells were solubilized on ice in lysis buffer [150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH7.4, 1 mM EDTA, 1 mM ethyleneglycol-O, O'-bis(2-aminoethyl)-N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA), 0.5% (vol/vol) Nonidet P-40 and 1% (vol/vol) Triton X-100]. To study the translocation of NF- $\kappa$ B p65 in the nucleus, nuclear protein extracts from U-87 MG cells were isolated using the NE-PER Nuclear and cytoplasmic extraction kit (Pierce, Rockford, IL). The resulting lysates or nuclear extracts (25  $\mu$ g protein) were solubilized in Laemmli sample buffer [125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 20% glycerol, 4% SDS, 10%  $\beta$ -mercaptoethanol, and 0.00125% bromophenol blue], boiled for 4 min, and separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). After electrophoresis, proteins were transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes which were then blocked 1 h at 4°C with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline/Tween 20 (TBS-T; 147 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, and 0.1% Tween 20). Membranes were further washed in TBS-T and incubated overnight with the primary antibody in TBS-T containing 3% bovine serum albumin (BSA) and 0.01% sodium azide (NaN<sub>3</sub>), followed by a 1 h incubation with HRP-conjugated anti-mouse or anti-rabbit antibodies in TBS-T containing 5% nonfat dry milk. Immunoreactive material was visualized with an ECL detection system. The immunoreactive bands were quantified with ImageJ software (NIH).

## Total RNA isolation, cDNA synthesis and real-time quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from U-87 MG monolayers using TRIzol reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD). For cDNA synthesis, 1  $\mu$ g of total RNA was reverse-transcribed into cDNA using a high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). cDNA was stored at -80°C prior to PCR. Gene expression was quantified by real-time quantitative PCR using iQ SYBR Green Supermix (BIO-RAD,

Hercules, CA). DNA amplification was carried out using an Icyler iQ5 (BIO-RAD, Hercules, CA) and product detection was performed by measuring binding of the fluorescent dye SYBR Green I to double-stranded DNA. The following primer sets were provided by QIAGEN (Valencia, CA): COX-2 (QT00040586), IL-1R1 (QT00081263), NF- $\kappa$ B p50<sup>NF- $\kappa$ B1</sup> (QT00154091), NF- $\kappa$ B p65<sup>RelA</sup> (QT00149415),  $\beta$ -Actin (QT01680476), GAPDH (QT00079247), PPIA (QT01866137). The relative quantities of target gene mRNA against an internal control,  $\beta$ -Actin/GAPDH/PPIA RNA, were measured by following a  $\Delta$ CT method employing an amplification plot (fluorescence signal vs. cycle number). The difference ( $\Delta$ CT) between the mean values in the triplicate samples of target gene and those of  $\beta$ -Actin/GAPDH/PPIA RNA were calculated by iQ5 Optical System Software version 2.0 (BIO-RAD, Hercules, CA) and the relative quantified value (RQV) was expressed as  $2^{-\Delta\text{CT}}$ . Semi-quantitative PCR was performed to examine amplification products and amplicons resolved on 1.8% agarose gels containing 1  $\mu$ g/ml ethidium bromide.

### **Cytotoxicity assays**

To assess the effect of luteolin on cell viability, the release of LDH upon damage of the plasma membrane was analyzed in the culture medium (containing 50 ng/mL IL-1 $\beta$ ) of U-87 MG cells. Samples from the cell medium were harvested from cells treated with luteolin for 24 h. LDH activity was measured at 30°C by a continuous optical test based on the extinction change of pyridine nucleotide at 340 nm as described by the manufacturer's instructions (Promega).

### **Fluorimetric caspase-3 assay**

Subconfluent U-87 MG cells were treated for 24 h with luteolin in the presence or absence of 50 ng/mL IL-1 $\beta$ . Cells were collected, washed in cold PBS and lysed in Apo-alert lysis buffer (Clontech, Palo Alto, CA) for 20 min at 4°C. and the lysates were clarified by centrifugation at 16,000  $\times$  g for 20 min. Caspase-3 activity was determined by incubation with 50  $\mu$ M of the caspase-3-specific fluorogenic peptide substrate acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin (Ac-DEVD-AFC) in assay buffer 50 mM Hepes-NaOH (pH 7.4), 100 mM NaCl, 10% sucrose, 0.1% 3-[(3-cholamidopropyl)

dimethylammonio]-1-propanesulfonate, 5 mM DTT and 1 mM EDTA] in 96-well plates. The release of AFC was monitored for at least 30 minutes at 37°C on a fluorescence plate reader (Molecular Dynamics) ( $\lambda_{ex}$ = 400 nm,  $\lambda_{em}$ =505 nm).

### **Transfection method and RNA interference**

U-87 MG cells were transiently transfected with 20 nM siRNA against IL-1R1 (SI00017584), NF- $\kappa$ B p50<sup>NF- $\kappa$ B1</sup> (SI01326990), NF- $\kappa$ B p65<sup>RelA</sup> (SI01399622) or scrambled sequences (AllStar Negative Control siRNA, 1027281) using Lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen, CA). Then, cells were treated for 24 h with luteolin in the presence or absence of 50 ng/mL IL-1 $\beta$ . Small interfering RNA and mismatch siRNA were synthesized by QIAGEN and annealed to form duplexes.

### **Immunofluorescence**

U-87 MG cells were grown on coverslips to 60% confluence, treated for 24 h with 15  $\mu$ M luteolin and then, incubated with 50 ng/mL IL-1 $\beta$  for 10 min. After that, cells were incubated in 10% formalin phosphate buffer for 20 min, followed by incubation in permeabilization buffer (0.5% triton X-100 in PBS) for 5 min and then blocked in 1% BSA and 0.1% NaN<sub>3</sub> in PBS for 1 h. The coverslips were incubated 1 h with anti-NF- $\kappa$ B p65 (1:500) in 1% BSA, 0.1% NaN<sub>3</sub> in PBS. After three PBS washes, the cells were incubated for 1 h with Alexa Fluor® 488 donkey anti-rabbit secondary antibody (1:200) in 1% BSA and 0.1% NaN<sub>3</sub>. The coverslips were then washed 3 times in PBS and laid down on microscope slides using ProLong Gold Antifade Reagent from Invitrogen (Carlsbad, NM). The samples were viewed under a confocal microscope using NIS Elements and Viewer and analyzed with the ImageJ softwares.

### **Statistical analysis**

Statistical analyses were assessed with Student's t-test when one group was compared with the control group. To compare two or more groups with the control group, one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's post hoc test was used. To investigate a significant interaction between two curves (control group vs treated group), a Tukey's post

hoc test and a trend analysis were performed. Differences with  $P < 0.05$  were considered significant.



### 3.6 Abbreviations

COX-2, cyclooxygenase-2; I $\kappa$ B, inhibitor of  $\kappa$ B; ERK, extracellular signal-regulated kinase; GRP78, glucose-regulated protein 78; IL-1 $\beta$ , interleukin-1 $\beta$ ; IL-1Ra, interleukin-1 receptor antagonist; IL-1R1, interleukin-1 receptor type I; JNK, c-Jun amino-terminal kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; NF- $\kappa$ B, nuclear transcription factor- $\kappa$ B; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate

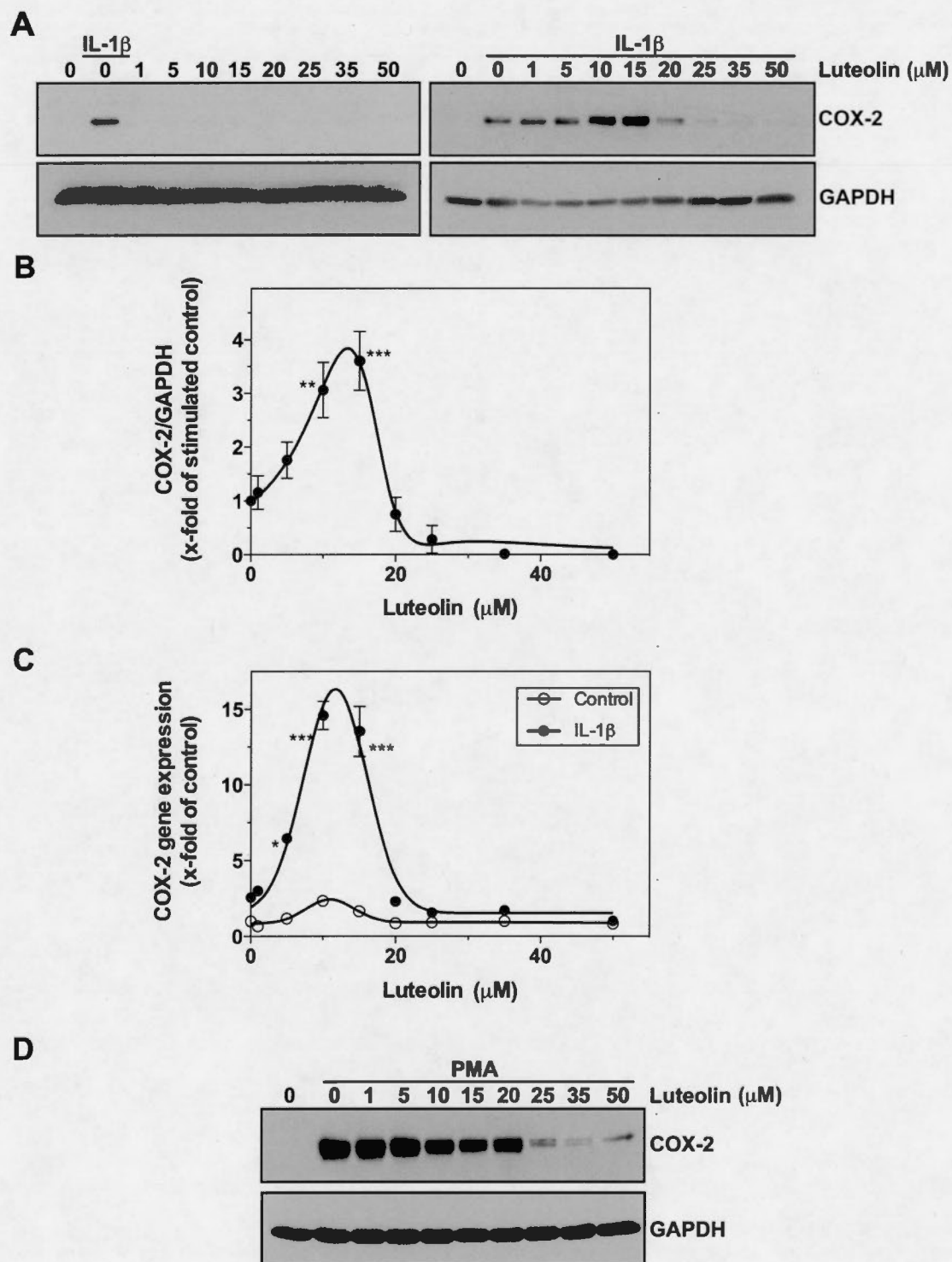
### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### 3.7 Acknowledgements

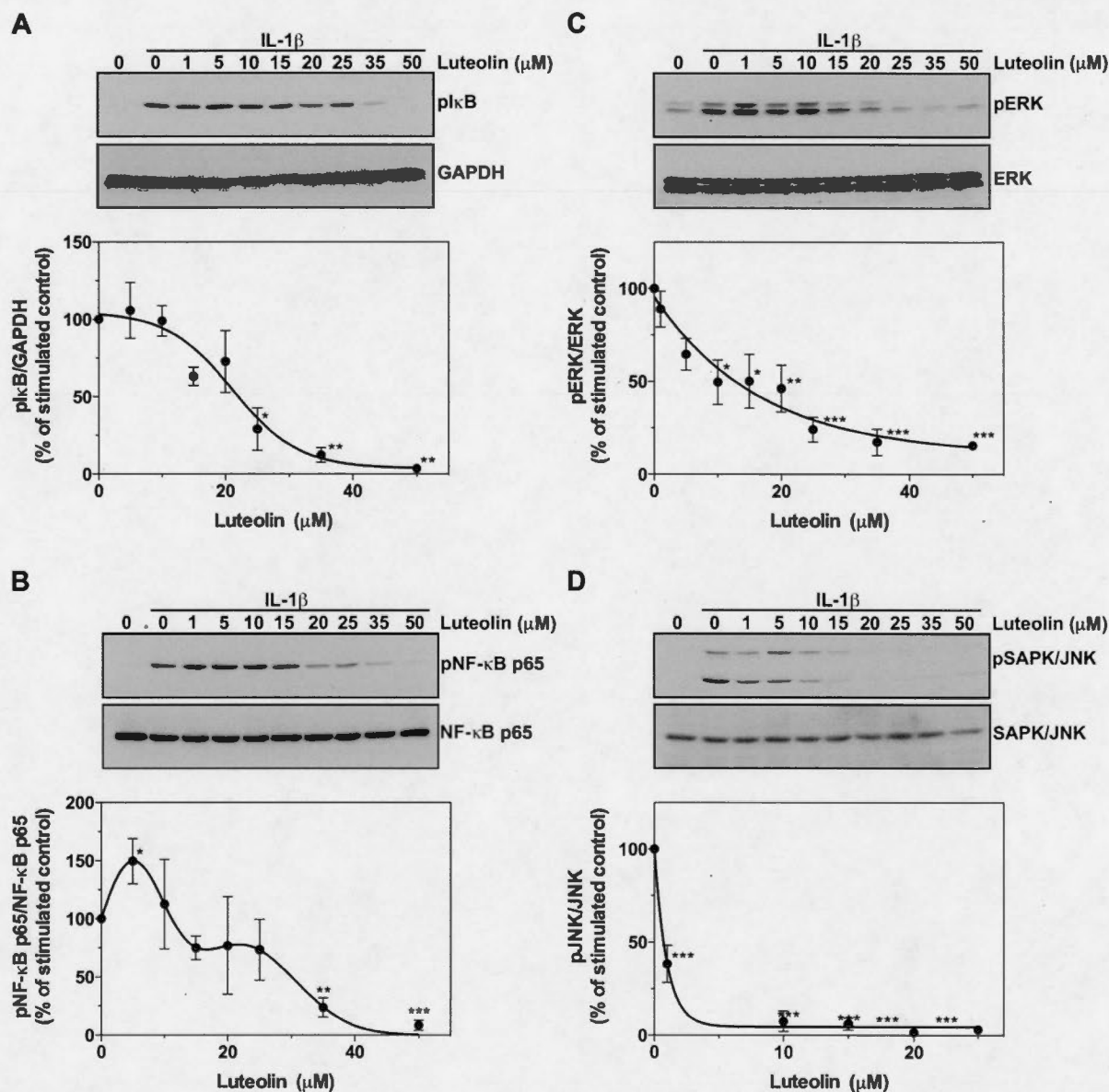
The authors thank Denis Flipo (Université du Québec à Montréal (UQÀM) for his technical support in the confocal microscopy acquisition and analysis. This work was funded by the Institutional Research Chair in Cancer Prevention and Treatment from UQÀM.

Fig.1



**Figure 1 Effect of luteolin on IL-1 $\beta$ -induced COX-2 gene and protein expression in human glioblastoma cells.** Subconfluent U-87 MG cells were serum-starved in the presence of various concentrations of luteolin containing (or lacking) 50 ng/mL IL-1 $\beta$  for 24 h. **(A)** Cells were lysed and the levels of COX-2 protein expression were monitored by immunoblotting. Immunodetections obtained from representative experiments are shown. **(B)** The band intensities were analyzed by scanning densitometry using ImageJ software and the quantification of three independent experiments is shown. Values are means  $\pm$ SEM (\*\* $p$  < 0.01 and \*\*\* $p$  < 0.001 versus IL-1 $\beta$  alone). For each sample, COX-2 level was normalized for GAPDH. **(C)** Total RNA was isolated from conditions described above and cDNA synthesis, and qPCR were performed to assess COX-2 gene expression. Values are means  $\pm$ SEM of three independent experiments (\* $p$  < 0.05 and \*\*\* $p$  < 0.001 versus basal control alone). **(D)** U-87 MG cells were serum-starved in the presence of various concentrations of luteolin containing (or lacking) 1  $\mu$ M PMA for 24 h. Western blot analysis of COX-2 levels, and GAPDH as a loading control, is shown.

Fig. 2



**Figure 2** Luteolin inhibits IL-1 $\beta$ -induced downstream signaling events in human glioblastoma cells. Subconfluent U-87 MG cells were serum-starved in the presence of various concentrations of luteolin for 24 h. Then, cells were stimulated with 50 ng/mL of IL-1 $\beta$  for 5 min. After cell treatments, the extent of phosphorylated forms of (A) IkB, (B) NF- $\kappa$ B, (C) ERK, or (D) JNK, along with their total protein level were monitored by immunoblotting. Immunodetection obtained from representative experiments are shown



(top panel). The band intensities were analyzed by densitometry using ImageJ software and expressed in arbitrary units as a ratio of levels of phosphorylated protein to those of the total protein to correct for variation in the amount of protein (bottom panel). For pI $\kappa$ B, each band was normalized for GAPDH. The relative levels of phosphorylated protein were also normalized to those seen in IL-1 $\beta$  control (value = 1). Values are means  $\pm$ SEM of three independent experiments (\* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01 and \*\*\* $p$  < 0.001 versus IL-1 alone).

Fig. 3

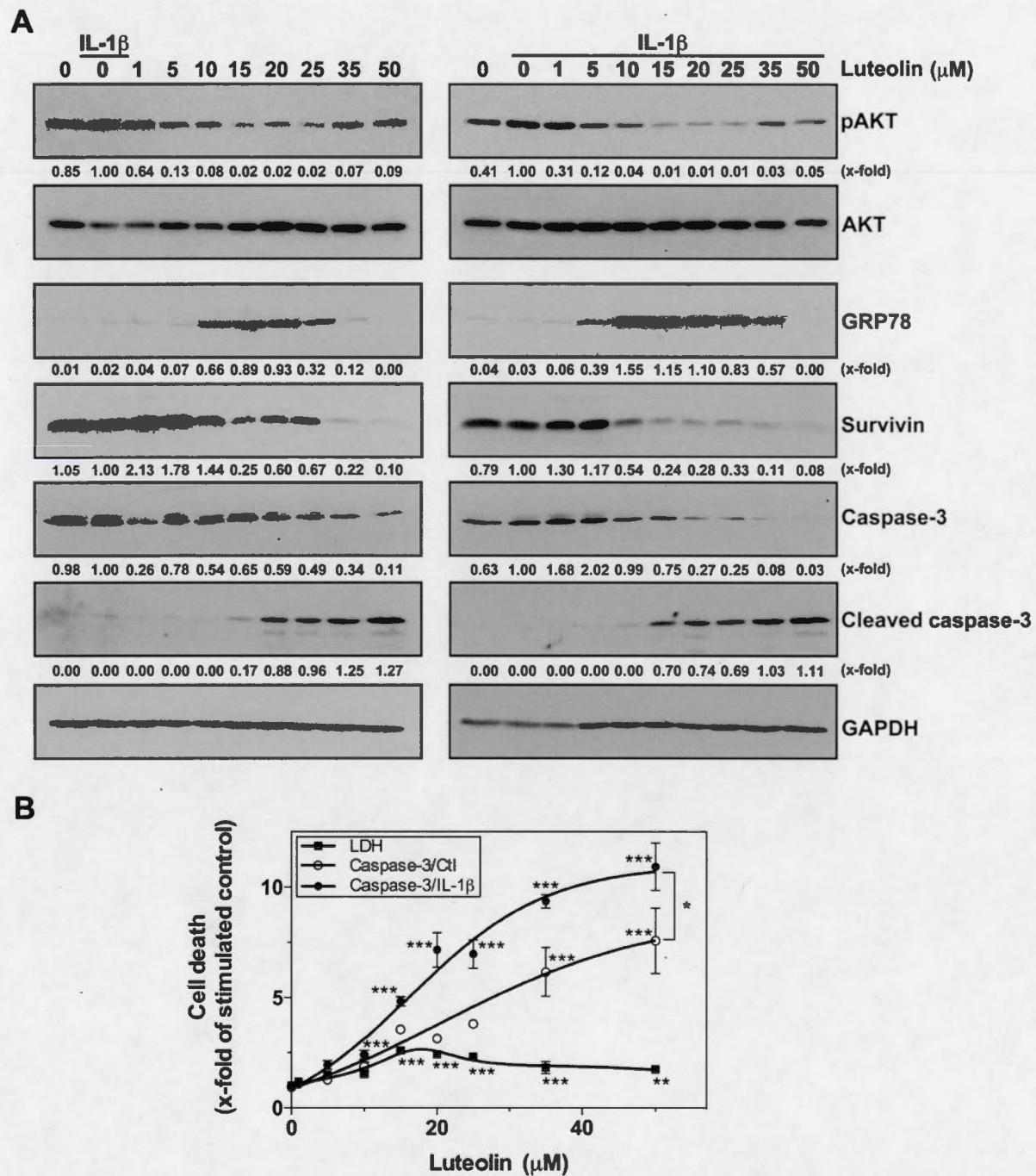
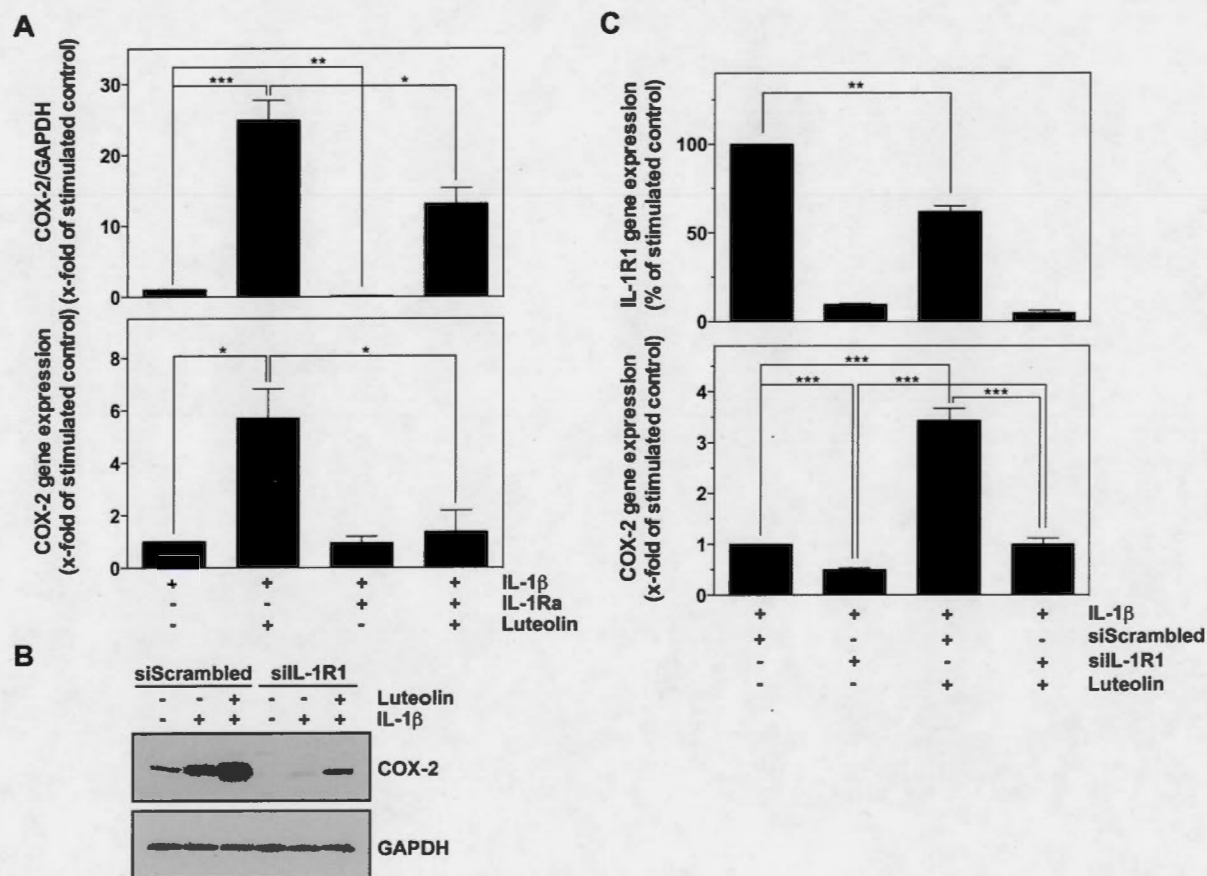


Figure 3 Luteolin modulates IL-1 $\beta$ -induced apoptotic and survival signaling pathways in human glioblastoma cells. Subconfluent U-87 MG cells were serum-starved

in the presence of various concentrations of luteolin containing (or lacking) 50 ng/mL IL-1 $\beta$  for 24 h. For AKT phosphorylation, IL-1 $\beta$  was added to the cells for 5 min. Representative Western blots from three independent experiments are shown for the expression of pAKT, AKT, GRP78, survivin, caspase-3, cleaved caspase-3, and GAPDH proteins. Western blots were quantified and bands were corrected for their specific protein loading control, AKT for pAKT, GAPDH for the others. The relative levels of phosphorylated AKT were also normalized to those seen in IL-1 $\beta$  control (value = 1). **(B)** Cell death was assessed by the extent of LDH release in the culture medium of each sample. Extracts from control and treated cells were used to determine DEVDase (caspase-3) activity, as described in the Methods section. Values are means  $\pm$ SEM of three independent experiments performed in triplicate (\*\* $p$  < 0.01 and \*\*\* $p$  < 0.001 versus IL-1 $\beta$  alone). Statistical significance of differences between control and IL-1 $\beta$  was calculated by one-way analysis of variance followed by Tukey's test and a trend analysis (\* $p$  < 0.05).

Fig. 4

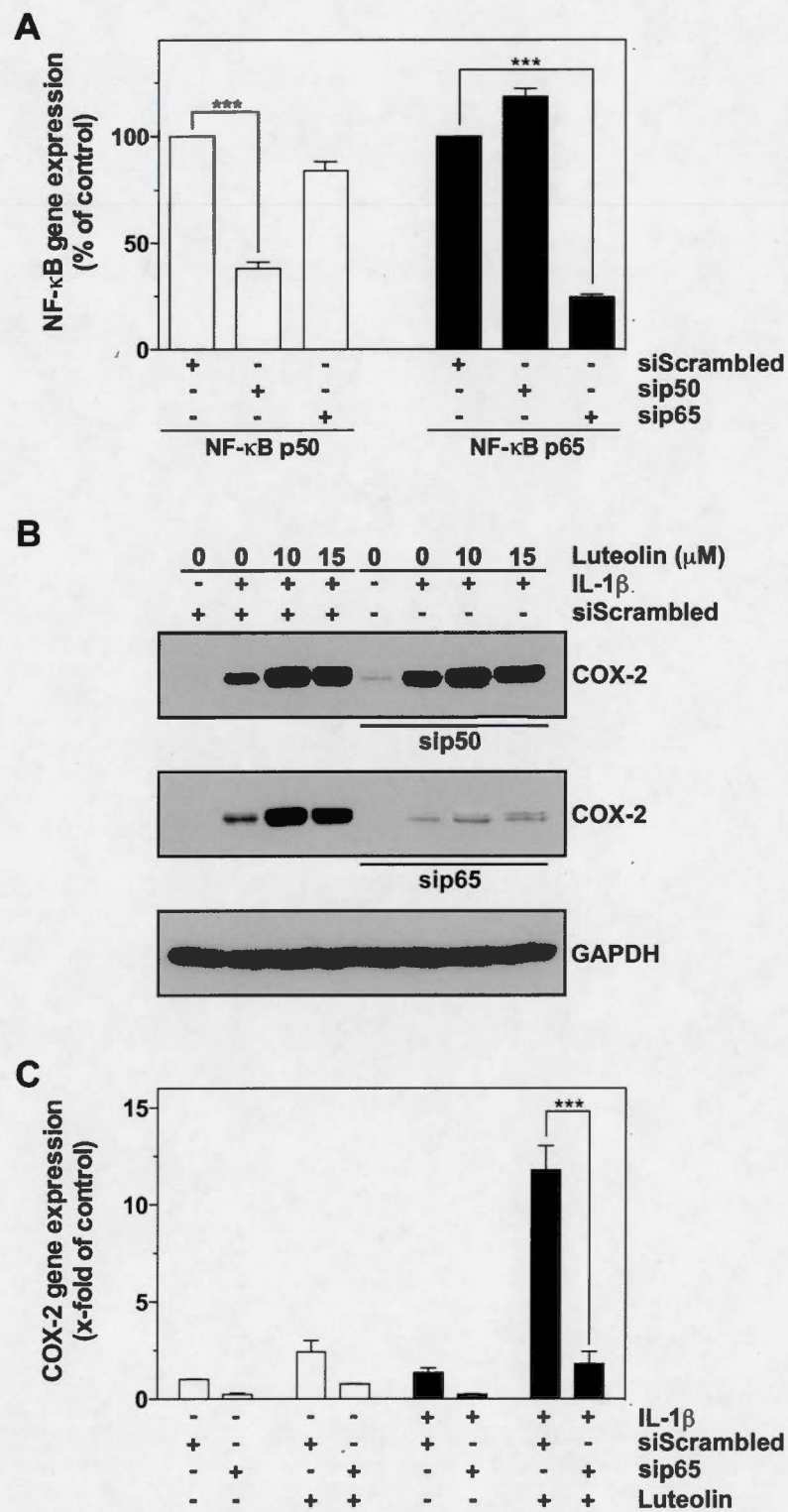


**Figure 4 IL-1 receptor antagonist and IL-1 receptor gene silencing affect IL-1 $\beta$ /luteolin-induced COX-2 gene and protein expression.** (A) Subconfluent U-87 MG cells were serum-starved in the presence of 50 ng/mL IL-1 $\beta$  containing (or lacking) 15  $\mu$ M of luteolin or 500 ng/mL IL-1Ra for 24 h. Then, cell lysates were isolated, electrophoresed via SDS-PAGE and immunodetection performed as described in the Methods section. Densitometric measurement was used to quantify the levels of COX-2 protein expression (top panel). Total RNA was isolated from conditions described above and cDNA synthesis and qPCR were performed to assess COX-2 gene expression (bottom panel). Values are means  $\pm$ SEM of three independent experiments (\* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01 and \*\*\* $p$  < 0.001 versus IL-1 $\beta$  alone). (B-C) U-87 MG cells were transiently transfected with siRNA against IL-1R (siIL-1R1) or with a scrambled sequence (siScrambled) as described in the Methods



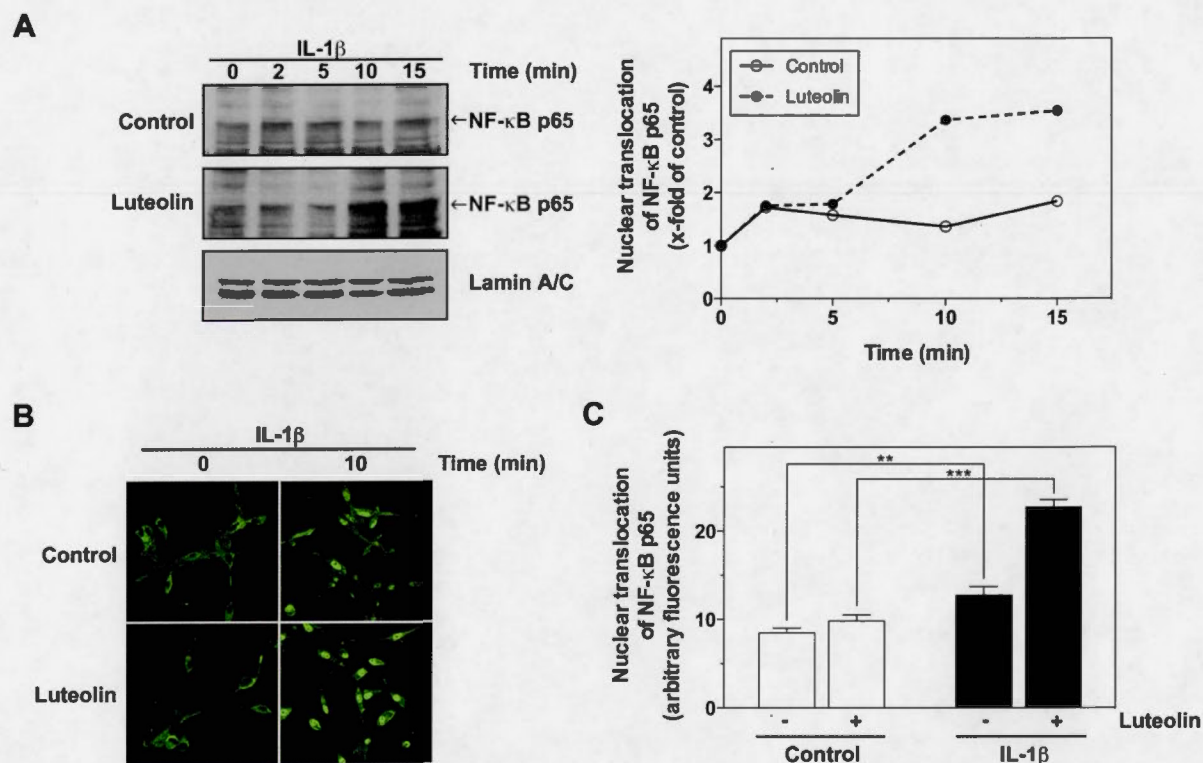
section. **(B)** Representative Western blots are shown for the expression of COX-2, and GAPDH as a loading control. **(C)** Total RNA was extracted and qRT-PCR was used to assess IL-1R1 and COX-2 gene expression upon treatment with 50 ng/mL IL-1 $\beta$  or 15  $\mu$ M of luteolin for 24 h. Values are means  $\pm$ SEM of three independent experiments (\*\* $p$  < 0.01 and \*\*\* $p$  < 0.001 versus IL-1 $\beta$  alone).

Fig. 5



**Figure 5 NF- $\kappa$ B p65, but not NF- $\kappa$ B p50, gene silencing reverses the effect of luteolin on IL-1 $\beta$ -mediated induction of COX-2 expression.** U-87 MG cells were transiently transfected with siRNA against NF- $\kappa$ B p50 (sip50), NF- $\kappa$ B p65 (sip65) or with a scrambled sequence (siScrambled) as described in the Methods section. **(A)** Total RNA was extracted and qRT-PCR was used to assess NF- $\kappa$ B p50 and NF- $\kappa$ B p65 gene expression in the siScrambled, sip50- and sip65-transfected U-87 MG cells. Values are means  $\pm$ SEM of three independent experiments ( $***p < 0.001$  versus IL-1 $\beta$  alone). **(B)** Representative Western blots are shown for the expression of COX-2, and GAPDH as a loading control. **(C)** Total RNA was extracted and qRT-PCR was used to assess COX-2 gene expression in the siScrambled, sip50- and sip65-transfected U-87 MG cells upon treatment with 50 ng/mL IL-1 $\beta$  or 15  $\mu$ M of luteolin for 24 h. Values are means  $\pm$ SEM of three independent experiments ( $**p < 0.01$  and  $***p < 0.001$  versus IL-1 $\beta$  alone).

Fig. 6



**Figure 6 Effect of luteolin on IL-1 $\beta$  translocation to the nucleus.** (A) Subconfluent U-87 MG cells were serum-starved in the presence (or absence) of 15  $\mu$ M luteolin for 24 h, followed with 50 ng/mL IL-1 $\beta$  stimulation for the indicated time. Nuclear cell fractions were prepared and submitted to Western blot analysis using antibodies against NF- $\kappa$ B p65, and lamin A/C as a loading control. Representative Western blots from at least three independent experiments are shown (*left panel*) and were quantified (*right panel*). (B) U-87 MG cells were seeded on coverslips for immunofluorescence and serum-starved in the presence of (or absence) of 15  $\mu$ M luteolin for 24 h. Then, cells were stimulated with 50 ng/mL of IL-1 $\beta$  for 10 min. The coverslips were fixed and incubated with anti-NF- $\kappa$ B p65 antibody. NF- $\kappa$ B p65-stained cells were then visualized using a fluorescence microscope. Representative images from two independent experiments are shown. (C) NF- $\kappa$ B p65 localized in the nucleus was quantified. Values are means  $\pm$ SEM of two independent experiments (\*\* $p$  < 0.01 and \*\*\* $p$  < 0.001).



## CHAPITRE IV

### 4.1 Discussion

Le processus inflammatoire a un impact sur toutes les étapes du développement du cancer (Marszalek *et al.*, 2012). Parmi les composantes du processus inflammatoire dans le microenvironnement tumoral, on trouve la cytokine pro-inflammatoire IL-1 et la COX-2 qui jouent un rôle majeur en tant que facteurs influençant les processus du développement tumoral (Marszalek *et al.*, 2012). La COX-2 est fortement régulée à la hausse dans les glioblastomes (Yoshino *et al.*, 2006). Il existe une corrélation entre le niveau de la COX-2 et les niveaux de l'IL-1. L'IL-1 joue un rôle important dans la régulation de la COX-2 (Marszalek *et al.*, 2012). Ces connaissances nous ont incités à utiliser l'IL-1 comme inducteur efficace de l'expression protéique et génique de la COX-2 *in vitro*.

La lutéoline, un flavonoïde commun existant dans de nombreux types de fruits, légumes et plantes médicinales (Ross et Kasum, 2002), a été utilisée comme un agent anti-inflammatoire dans la médecine traditionnelle (Bagli *et al.*, 2004). Bien que cet effet de la lutéoline soit clairement connu, personne n'a jamais élucidé les mécanismes par lesquels la lutéoline exerce son effet anti-inflammatoire sur les voies de signalisation modulées par l'IL-1, dans des cellules de glioblastome. Nos expériences *in vitro* démontrent des résultats impressionnants en ce qui concerne les effets de la lutéoline sur l'expression et la modulation des voies inflammatoires. On peut affirmer avec confiance que dans les cellules U87, la lutéoline inhibe l'expression protéique et génique de la COX-2, induite par l'IL-1. La lutéoline exerce ses effets sur l'expression de la COX-2 de manière très inattendue à des faibles concentrations de lutéoline, l'expression protéique et génique de COX-2 est augmentée, avant qu'elle n'inhibe son expression à des concentrations plus élevées. On remarque une action biphasique de la lutéoline en synergie avec l'IL-1, car on n'observe aucun effet significatif en absence de l'IL-1. L'inhibition de l'expression de la COX-2 a déjà été rapportée par des études précédentes, mais à notre connaissance, aucune étude n'a encore démontré l'activité biphasique de la lutéoline sur l'expression de cette protéine. Afin de confirmer nos résultats, des études similaires ont été effectuées sur la même lignée cellulaire, en induisant l'expression de la COX-2 par le PMA. En présence de la lutéoline, une inhibition de la COX-2 de façon dose-dépendente a été observée, mais l'effet biphasique n'a pas été perçu. L'ensemble de ces résultats nous permet d'affirmer

que l'effet biphasique de la lutéoline observé sur l'expression de la COX-2 est spécifiquement relié à l'induction de la COX-2 par la voie de l'IL-1 et nécessite un récepteur à l'IL-1.

Afin de mieux comprendre l'action biphasique de la lutéoline sur l'expression de la COX-2, les voies de signalisation potentiellement impliquées ont alors été explorées. En présence de l'antagoniste du récepteur d'IL-1, l'interaction synergique de l'IL-1 à de faibles concentrations de lutéoline sur la hausse d'expression protéique et génique de la COX-2 est toujours maintenue, quoique légèrement réduite. Bien que la COX-2 soit induite en aval, une série d'évènements conséquents à l'interaction de l'IL-1 avec son récepteur 1 est observée. Il semble que l'IL-1 puisse exercer son action sur l'expression de la COX-2 à travers d'autres voies. L'action de la lutéoline est également observée sur l'expression génique du récepteur à l'IL-1. Il est possible que la lutéoline agisse directement sur le récepteur de l'IL-1, ce qui apporte une compétition avec l'antagoniste du récepteur d'IL-1 pour occuper le récepteur. Cette hypothèse peut expliquer la faible expression de la COX-2 en présence de l'antagoniste du récepteur. La lutéoline exerce son effet anti-inflammatoire par la suppression de la production de ces cytokines et de leurs voies de transduction de signal (Xagorari *et al.*, 2001; Kumazawa *et al.*, 2006).

La suppression de la signalisation induite par la cytokine inflammatoire est au moins en partie attribuée au niveau du récepteur, parce que l'accumulation des radeaux lipidiques, étape critique pour la signalisation du récepteur, serait bloquée par la lutéoline (Kumazawa *et al.*, 2006). L'effet inhibiteur de la lutéoline sur la COX-2 serait donc associé à une altération des événements de signalisation en aval du récepteur d'IL-1, dont l'inhibition de l'activation de la voie NF-kB. L'IL-1 $\beta$  exerce plusieurs de ses effets biologiques en activant le facteur de transcription NF-kB, qui, à son tour, régule l'expression des gènes oncogènes et inflammatoires (Hanada et Yoshimura, 2002). Nos résultats montrent une inhibition de l'activation de la voie classique pro-inflammatoire IL-1/NF-kB/COX-2 dans les cellules de glioblastomes traitées par la lutéoline. L'effet inhibiteur de la lutéoline sur l'activation de la voie NF-kB a aussi été détecté dans les cellules du cancer des poumons (Shi *et al.*, 2004). De plus, nous observons une inhibition de la phosphorylation sur les deux sous-unités du NF-kB, la p65 et la p105, qui se produit de façon concentration-dépendante. Il est déjà connu que l'activation de la voie NF-kB médiée par l'IL-1 implique la phosphorylation et la dégradation subséquente de l'inhibiteur

de NF- $\kappa$ B, l'I $\kappa$ B, entraînant la libération cytoplasmique et la translocation nucléaire du NF- $\kappa$ B (Auron, 1998).

L'inhibition de l'expression génique des deux sous-unités, p50 et p65, de NF- $\kappa$ B par le traitement des cellules avec le siRNA correspondant, ne réduit pas entièrement la capacité des cellules U87 à exprimer la COX-2. Aux concentrations de lutéoline auxquelles la COX-2 est induite fortement, respectivement 10 et 15  $\mu$ M, la suppression de la sous-unité p50 permet tout de même, l'expression génique de la COX-2 induite par l'IL-1, mais à moindre intensité. Ce qui est intéressant est que, aux mêmes concentrations de lutéoline, l'inhibition de la sous-unité p65, bloque complètement l'expression génique de la COX-2 induite par l'IL-1. Les mêmes effets du siRNA des deux sous-unités au niveau de l'expression de la COX-2 sont observés au niveau protéique. On peut conclure, en se basant sur ces résultats, que la sous-unité p65 joue un rôle plus important dans la transcription génique de la COX-2 que la sous-unité p50. Cette expérience nous confirme aussi que l'expression de la COX-2 induite par l'IL-1 nécessite la voie NF- $\kappa$ B.

Afin de confirmer nos observations, nous avons regardé si l'action de la lutéoline sur I $\kappa$ B est en corrélation avec l'inhibition de l'activité de NF- $\kappa$ B. Le prétraitement des cellules avec la lutéoline a supprimé les effets de l'IL-1 sur la phosphorylation et la dégradation I $\kappa$ B- $\alpha$ . Des études montrent que la lutéoline inhibe l'activation de NF- $\kappa$ B par inhibition de l'activation de IKK au cours de l'inflammation dans les cellules épithéliales et les macrophages (Xagorari *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2007; Kim et Jobin, 2005). De plus, en corrélation avec la dose de lutéoline, la translocation de NF- $\kappa$ B au noyau diminue aussi, ce qui appuie les observations sur la diminution de l'expression génique et protéique de la COX-2.

Récemment, il a été rapporté que l'expression de la COX-2 peut être régulée par différentes voies de signalisation des MAP kinase et que la voie de signalisation impliquée dépend, particulièrement, du type de stimuli. Dans les cellules U87, l'IL-1 induit la phosphorylation d'ERK, de p38 et de JNK. L'augmentation dans les niveaux de phosphorylation de ces kinases par l'IL-1 était transitoire, avec un maximum de phosphorylation à 10 minutes post-stimulation. Le traitement des cellules U87 avec des concentrations croissantes de lutéoline a interféré de façon dose dépendante avec la phosphorylation des diverses protéines impliquées dans la voie de signalisation de l'IL-1R



telles p38, ERK et JNK. Le traitement à l'IL-1 stimule la phosphorylation de la p38, JNK et ERK. La lutéoline mène clairement à une inhibition de la voie ERK mais aussi des autres voies de régulation clés, tels que la p38 et JNK. Étant donné qu'il existe différents mécanismes de modulation des voies de signalisation dans les cellules normales et les cellules cancéreuses malignes, cela explique le fait que la lutéoline supprime JNK dans les macrophages alors qu'elle affecte cette kinase dans les cellules cancéreuses (Shi *et al.*, 2004; Ju *et al.*, 2007). Nos résultats ont démontré que la lutéoline supprime l'activation de JNK dans les cellules tumorales U87.

Des études antérieures ont démontré que la lutéoline inhibe les réactions inflammatoires et la régulation de la voie de signalisation ERK dans les cellules épithéliales du côlon humain (Hong et Grabel, 2006). Il est connu que l'augmentation de la signalisation d'ERK est fortement corrélée avec la prolifération et la métastase des glioblastomes. L'activation constitutive de la signalisation d'ERK est une caractéristique de nombreux cancers, comme celui du sein, du poumon, le cancer colorectal et le mélanome. La diminution de la phosphorylation de cette voie apportée par la lutéoline pouvait donc jouer un rôle dans la prévention de l'invasion des cellules tumorales (Cheng *et al.*, 2013). Les membres de la famille MAP kinase sont de forts promoteurs de l'invasion tumorale. L'inhibition de l'un des candidats de cette famille conduit à la réduction considérable de l'envahissement de gliome *in vitro* (Demuth *et al.*, 2007). Ce modèle *in vitro* qui est de plus en plus utilisé consiste à mesurer la vitesse de l'invasion des cellules tumorales à travers le Matrigel, un mélange complexe des composants de matrices extracellulaires dérivées du sarcome *Engelbroth-Holm-Swarm* (EHS) (Radotra McCormick, 1997). Afin d'examiner si l'activation des MAPK est impliquée dans la voie de transduction du signal conduisant à l'expression de la COX-2 causée par l'IL-1, nous avons utilisé des inhibiteurs pharmacologiques de MAPK. Parmi tous les inhibiteurs utilisés, seul le SB203580, un inhibiteur sélectif de la p38, a fortement réprimé l'expression de la COX-2, du même niveau que l'utilisation de la lutéoline. Ce résultat suggère l'implication de cette voie, induite par l'IL-1, dans l'expression de la COX-2. D'autres études effectuées sur les cellules U87 ont confirmé aussi l'implication de la voie p38 dans l'expression de la COX-2 (Kim *et al.*, 2004).

Dans les recherches sur le cancer de la prostate, les chercheurs ont découvert que la lutéoline supprime la prolifération et provoque l'apoptose *in vitro* et *in vivo* par



l'inhibition de la voie de signalisation IGF/1R/AKT (Fang *et al.*, 2007). De nombreux facteurs de croissance régulent les voies de transduction du signal PI3K/Akt. Akt est une kinase indispensable à l'organisme qui promeut la prolifération et la migration des cellules. Par conséquent, la régulation de l'Akt est une condition importante pour la promotion de la survie ou de l'apoptose cellulaire. La phosphorylation d'Akt s'effectue à la fois sur la Thr308 et Ser473 et est essentielle pour l'activation complète de cette kinase (Persad *et al.*, 2001). Il a été rapporté que par des interactions avec la voie de signalisation PI3K/Akt, la lutéoline peut jouer un rôle dans l'inhibition de la prolifération cellulaire et de la migration (Bagli *et al.*, 2004). Notre étude sur les cellules de glioblastome a également indiqué une régulation de la voie d'Akt par la lutéoline. Le prétraitement des cellules avec la lutéoline réduit de façon significative le niveau de phosphorylation d'Akt. Ruiz *et al.* (2006) ont montré que la lutéoline bloque sélectivement la phosphorylation et l'activité d'Akt induite par le TNF- $\alpha$  dans les cellules murines non-carcinogènes de cellules épithéliales intestinales (IEC), et que la lutéoline à 100  $\mu$ M provoquait une inhibition de longue durée sur 24 h. De plus, il a été rapporté que la lutéoline inhibe l'activation d'Akt dans les cellules cancéreuses de prostate PC-3 et DU145 (Fang *et al.*, 2007). L'inhibition de l'Akt est apparue à des concentrations de lutéoline de 10  $\mu$ M et était presque complète à 40  $\mu$ M. Ces résultats sont cohérents avec les nôtres dans les cellules de glioblastome.

Dans un souci d'explorer les mécanismes potentiels impliqués dans la prévention de l'inflammation et le potentiel de la lutéoline dans la thérapie contre le cancer, nous avons systématiquement examiné le niveau de cytotoxicité cellulaire de la lutéoline à la concentration à laquelle nous observons ces effets. La lutéoline ne présente aucune cytotoxicité. Par contre, nous avons constaté que la lutéoline induit l'apoptose de façon dose-dépendante dans les cellules de glioblastomes en présence de l'IL-1. L'induction de l'apoptose dans les cellules traitées par la lutéoline en présence de l'IL-1 est confirmée par une augmentation de la caspase-3 clivée et par une diminution de la caspase-3 non clivée. Simultanément au clivage de la caspase-3, une diminution de la survivine a été aussi constatée, ce qui confirme l'état apoptotique des cellules. La synergie entre la lutéoline et l'IL-1 sur la promotion de l'apoptose a été suggérée autant par les mesures effectuées au FACS que par le test de la caspase-3. Enfin, le test du LDH a confirmé que l'effet pro-apoptotique de la lutéoline dans les cellules cancéreuses de glioblastome n'est pas causé par une cytotoxicité de la molécule, mais plutôt par une interférence avec les voies de prolifération ou anti-apoptotique. D'autres études effectuées sur le même type cellulaire

ont confirmé que, à des concentrations inférieures à 30  $\mu\text{M}$ , la lutéoline ne présente pas de cytotoxicité (Cheng *et al.*, 2013). La lutéoline peut déclencher l'apoptose dans les cellules en agissant directement sur les voies apoptotiques ou en supprimant diverses voies impliquées dans la survie cellulaire (Lin *et al.*, 2008).

On peut relier l'induction de l'apoptose avec la diminution de l'expression de la protéine de stress GRP78. En présence de la lutéoline et l'IL-1, l'expression protéique et génique de la GRP78 augmente lorsque les concentrations de lutéoline sont plus basses et diminue lorsque la concentration de la lutéoline augmente. La GRP78 joue un rôle dans la survie, la prolifération et la résistance apoptotique des cellules cancéreuses. La GRP78 interagit avec la caspase-7 et caspase-12 dans le RE et inhibe l'activation de ces facteurs favorisant l'apoptose. La GRP78 est induite en réponse au stress du RE et protège les cellules de l'apoptose (Li et Li, 2012). On observe un apport du stress par la lutéoline, indépendamment de la présence de l'IL-1, ce qui se reflète par la hausse de l'expression de la GRP78 observée. Étant donné que la GRP78 est élevée en condition de stress en favorisant la survie des cellules, sa diminution lors du traitement avec des concentrations de lutéoline plus élevées suggère la présence des cellules en apoptose. Des études précédentes de Weng *et al.*, (2012) ont montré aussi que la lutéoline a retardé le processus de prolifération des cellules cancéreuses d'œsophage Eca109 et a prédisposé les cellules à l'apoptose. De plus, il a été documenté que la lutéoline induit la mort cellulaire par apoptose dans plusieurs types de cellules cancéreuses, y compris le carcinome épidermoïde, la leucémie, le cancer du pancréas, et l'hépatome (Lee *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 1999; Cheng *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005). Bien que les mécanismes sous-jacents à l'apoptose induite par la lutéoline sont complexes, ils peuvent être résumés par un bris de l'équilibre entre la survie et la mort cellulaire, soit en stimulant les voies apoptotiques, soit en inhibant la signalisation de survie dans les cellules cancéreuses.

Les activités pharmacologiques de la lutéoline pourraient être fonctionnellement liées les unes aux autres. Par exemple, l'effet anti-inflammatoire de la lutéoline peut être lié à sa fonction anti-cancéreuse. La propriété anti-cancéreuse de la lutéoline peut être associée à son pouvoir d'induction de l'apoptose, ce qui englobe la régulation d'oxydo-réduction, des dommages de l'ADN et des protéines kinases impliquées dans la suppression de la prolifération, de la métastases et de l'angiogénèse des cellules cancéreuses (Lin *et al.*, 2008).

La biodisponibilité, la pharmacocinétique et le métabolisme des flavonoïdes sont des paramètres importants et, il est opportun d'évaluer leur immense rôle dans la chimio-prévention des maladies tel que le cancer. La lutéoline se trouve dans les plantes sous une forme glycosylée. Après ingestion, les glycosides lutéoline sont hydrolysés à leur forme libre biologiquement active (aglycone) dans la muqueuse intestinale. La lutéoline aglycone est ensuite absorbée, et surtout glucuronidée peu de temps après. Cependant, les métabolites de flavonoïdes ont une activité biologique réduite par rapport à la molécule mère. L'absorption intestinale de la lutéoline a été étudiée par Shimoi *et al.* (1998) qui ont constaté que la lutéoline est mieux absorbée dans le duodéno-jéjunum que dans l'iléon. Des études sur les rats ont révélé que la concentration plasmatique maximale de la lutéoline est  $1.97 \pm 0.15$  pmol/L après l'administration orale de 14,4 mg/kg de lutéoline. Le temps pour atteindre la concentration plasmatique maximale était de  $1,02 \pm 0,22$  heures et la demi-vie de la lutéoline était  $4,94 \pm 1,2$  heures. Les résultats obtenus d'autres expériences effectuées chez le rat après une seule administration orale de *Chrysanthemum morifolium* (200 mg / kg), une plante contenant de la lutéoline et de l'apigénine comme molécules actives ont montré une dose totale de récupération de 37,9% (6,6% dans l'urine; 31,3% dans les fèces) pour la lutéoline et 45,2% (16,6% dans l'urine, de 28,6% dans les fèces) pour l'apigénine. La dose de la lutéoline excrétée dans la bile était de 2,05% de la dose initiale. La lutéoline a une phase d'élimination lente, avec une absorption rapide, il est donc envisageable d'avoir une accumulation de ce flavonoïde dans le corps (Chen *et al.*, 2007).

D'autres études montrent que l'absorption intestinale de polyphénols peut être élevée. La concentration maximale plasmatique d'une molécule individuelle dépasse rarement 1  $\mu$ M après la consommation de 10 à 100 mg d'un composé phénolique unique (Scalbert et Williamson, 2000). Toutefois, la concentration plasmatique totale des phénols est probablement plus élevée en raison de la présence de métabolites formés dans les tissus de l'organisme ou par la microflore intestinale. Il sera important d'en apprendre davantage au sujet de ces métabolites, notamment en raison de leur puissante activité biologique (Scalbert et Williamson, 2000). Étant donné que la concentration à partir de laquelle les effets bénéfiques de la lutéoline commencent à être importants, est de 20  $\mu$ M et plus, il est nécessaire de consommer une grande quantité des sources contenant de la lutéoline.

En général, on croit que la biodisponibilité orale de flavonoïdes est très faible. Mais, selon les résultats, la biodisponibilité de la lutéoline dérivée des plantes serait beaucoup plus élevée que celle de la lutéoline pure (Zhou *et al.*, 2008). Des données relatives à la sécurité des flavonoïdes soutiennent leur utilisation comme complément alimentaire. Il a été documenté que la supplémentation diététique de 1 g/jour de la molécule la plus proche de la lutéoline, la quercétine, chez l'homme, est sécuritaire et sans effets cytotoxiques (Conquer *et al.*, 1998). Une étude chez des rongeurs n'a montré aucune toxicité de la lutéoline (jusqu'à 10 mg/kg donnée IP) administrée quotidiennement pendant 18 jours (Fang *et al.*, 2007). Les mesures sur la teneur totale en flavonoïdes dans le régime alimentaire des différentes populations ont révélé que l'apport moyen total en flavonoïdes est habituellement de l'ordre de 100 à 200 mg / jours : les flavonoles, avec la quercétine et le kaempférol comme principaux composants, contribueront entre 5-20 mg / jour, les flavones seulement environ 1 mg, ou moins, dont jusqu'à 90% de la fraction des flavones est représenté par l'apigénine, en laissant environ 0,1 mg / jour à la lutéoline (Seelinger *et al.*, 2008). Des concentrations considérables de la lutéoline se trouvent dans quelques épices comme le thym, le persil, la sauge, et dans les carottes sauvages, mais les principales sources nutritionnelles de lutéoline sont cachées dans le céleri, les épinards, certaines variétés de poivrons et la laitue. Les attentes pour trouver des effets sur la santé des flavones (ou même de la lutéoline) en corrélation avec ces études épidémiologiques devraient donc être modérées (Seelinger *et al.*, 2008).

La présente étude a porté sur la lutéoline, parce que des rapports précédents comparant ses propriétés anti-inflammatoires à d'autres flavonoïdes comme la quercétine, la génistéine, ou hespérétine dans les macrophages périphériques, ont suggéré que la lutéoline était la plus apte à engendrer des effets prometteurs (Comalada *et al.*, 2006; Xagorari *et al.*, 2001). Récemment, il a été trouvé que la lutéoline inhibait la microglie dans plusieurs modèles d'inflammation *in vitro* (Chen *et al.*, 2008; Rezai-Zadeh *et al.*, 2008). Il a été spéculé pendant un certain temps, que les flavonoïdes sont capables d'inhiber l'inflammation dans le cerveau (Youdim *et al.*, 2004). La lutéoline exerce ses effets neuroprotecteurs par son action directe sur les cellules microgliales. Cette observation est cohérente avec le rôle bien documenté des médiateurs inflammatoires dans la progression des maladies neurodégénératives (Block et Hong, 2005). Ces rapports antérieurs ont incité d'approfondir notre recherche sur les effets de la lutéoline. De plus, la lutéoline est perméable à la barrière hémato-encéphalique, la rendant applicable au

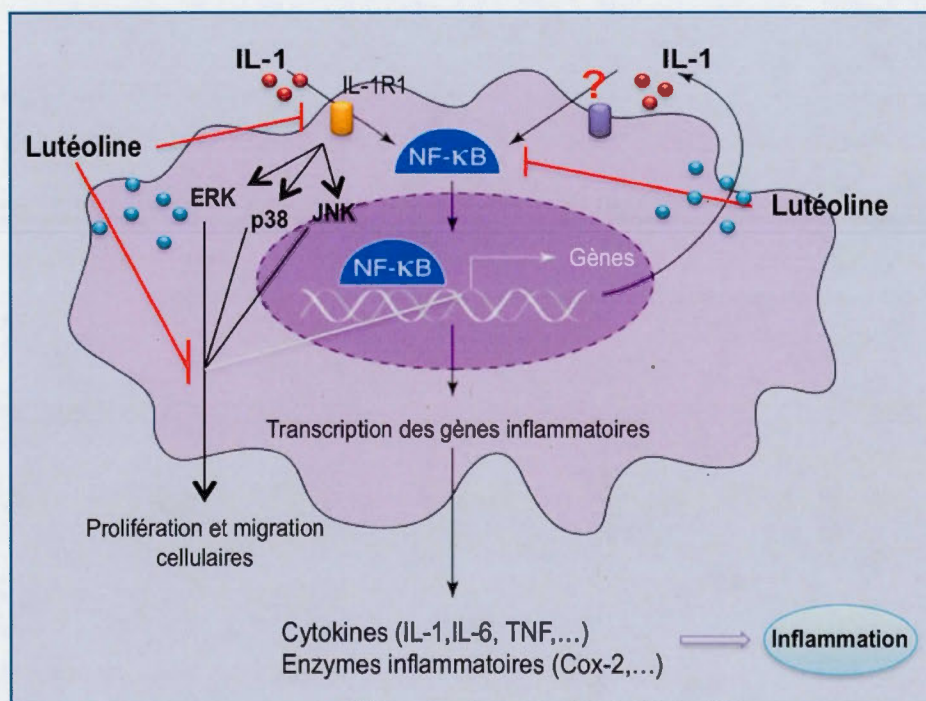


traitement des maladies du système nerveux central, y compris le cancer du cerveau (Wruck *et al.*, 2007).

#### 4.2 Conclusions et perspectives

Nos résultats démontrent que la lutéoline module les voies inflammatoires induites par l'IL-1 et impliquées dans la régulation de la COX-2 dans les cellules de glioblastomes. L'inhibition de la COX-2 par la lutéoline se produit de façon biphasique. L'activation de diverses protéines impliquées dans la voie de signalisation de l'IL-1R telles NF-kB, IκB, p38, ERK et JNK est inhibée par la lutéoline de façon concentration dépendante. L'action biphasique de la lutéoline est également observée sur l'expression génique du récepteur à l'IL-1 (IL-1R). L'interaction synergique de l'IL-1 avec de faibles concentrations de lutéoline sur la hausse d'expression protéique et génique de la COX-2 est toujours maintenue, mais plus faiblement, en présence d'un antagoniste du récepteur à l'IL-1. De plus, cette hausse s'accompagne d'une augmentation de la translocation de NF-kB dans le noyau. Étant donné que l'inflammation et les voies de signalisation impliquées sont fortement associées à la cancérogenèse, le rôle anti-inflammatoire et l'activité inhibitrice de la lutéoline pourraient donc contribuer à la prévention du cancer (figure 10).

Les études épidémiologiques suggèrent que l'apport alimentaire de flavonoïdes est inversement associé au risque de cancer du poumon, de la prostate, de l'estomac et le cancer du sein chez l'homme (Neuhouser, 2004; Knekt *et al.*, 1997). Les résultats documentés suggèrent que la lutéoline possède une variété de propriétés bénéfiques, y compris celles d'agent anti-inflammatoire et anticancéreuse. Les résultats des études suggèrent que l'apport alimentaire de la lutéoline réduirait le risque de cancer d'ovaire, mais des études prospectives sont encore nécessaires (Gates *et al.*, 2007). Dans un modèle de cancer du côlon, la lutéoline réduit de façon significative l'incidence du cancer du côlon lorsque son administration a été effectuée soit à la phase d'initiation ou post-initiation (Manju et Nalini, 2007). Les résultats démontrent que la lutéoline exerce des effets chimio-préventifs et anticancéreux, en association avec ses effets antioxydants contre le cancer du côlon (Manju et Nalini, 2007). Les données provenant d'études antérieures suggèrent que la lutéoline est un agent anticancéreux prometteur. Des études précliniques seront nécessaires pour établir l'efficacité et la sécurité de la lutéoline seule ou en combinaison avec d'autres traitements avant de procéder à des essais cliniques.



**Figure 10.** La modulation par la lutéoline des voies de signalisation et des médiateurs pro-inflammatoires impliqués dans le cancer.

Bien que nos recherches aient démontré des effets inhibiteurs de la lutéoline envers les biomarqueurs pro-inflammatoires et certaines voies de signalisation, nous sommes encore loin de comprendre les détails des mécanismes par lesquels la lutéoline exerce son action bénéfique. L'effet spécifique de la lutéoline sur l'expression de la COX-2 induite par l'IL-1 nous incite à mieux connaître cette spécificité directement liée à l'IL-1 et son récepteur. Afin d'approfondir la compréhension de l'action de la lutéoline, il serait intéressant, dans les études futures, de se concentrer sur la protéine IL-1RAP et son interaction avec la lutéoline en ce qui trait à l'expression de la COX-2 et les voies de signalisation impliquées. Étant donné que la gamme des récepteurs de l'IL-1 est assez élaborée, il nous incombe également de vérifier l'hypothèse suggérant que l'IL-1 exerce son action à travers une autre voie, en interagissant avec un autre type de récepteur, soit un récepteur de la famille des TLR ou même par un des membres de la famille des récepteurs d'IL-1. Puisque la finalité de toute recherche est d'employer les résultats obtenus dans les conditions physiologiques, il est à considérer d'évaluer aussi les effets de la lutéoline *in vivo*.

## RÉFÉRENCES

Aggarwal B B, Gehlot P. 2009. *Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients?* Curr Opin Pharmacol. 4:351-369.

Ahmad M, Srinivasula S M, Hegde R, Mukattash R, Fernandes-Alnemri T, Alnemri E S. 1998. *Identification and characterization of murine caspase-14, a new member of the caspase family.* Cancer Res. 58:5201-5205.

Altieri D C. 2003. *Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer.* Oncogene. 22:8581-8589.

Amin A R, Kucuk O, Khuri F R, Shin D M. 2008. *Perspectives for cancer prevention with natural compounds.* J Clin Oncol. 27:2712-2725.

Anand P, Kunnumakkara A B, Sundaram C, Harikumar K B, Tharakan S T, Lai O S, Sung B, Aggarwal B B. 2008. *Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes.* Pharm Res. 25:2097-2116.

Ansari S A, Safak M, Del Valle L, Enam S, Amini S, Khalili K. 2001. *Cell cycle regulation of NF-kappa b-binding activity in cells from human glioblastomas.* Exp Cell Res. 265:221-233.

Apte R N, Dotan S, Elkabets M, White M R, Reich E, Carmi Y, Song X, Dvozkin T, Krelin Y, Voronov E. 2006. *The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions.* Cancer Metastasis Rev. 25:387-408.

Auron P E. 1998. *The interleukin 1 receptor: ligand interactions and signal transduction.* Cytokine Growth Factor Rev. 9:221-237.

Bagli E, Stefaniotou M, Morbidelli L, Ziche M, Psillas K, Murphy C. 2004. *Luteolin inhibits vascular endothelial growth factor-induced angio-genesis; inhibition of endothelial cell survival and proliferation by targeting phosphatidylinositol 3'-kinase activity.* Cancer Res. 64:7936-7946.

Balkwill F, Mantovani A. 2001. *Inflammation and cancer: back to Virchow?* Lancet 357:539-545.

Béliveau R, Gingras D. 2007. *Role of nutrition in preventing cancer.* Can Fam Physician. 53:1905-1911.

Benson J D, Chen Y N, Cornell-Kennon S A, Dorsch M, Kim S, Leszczyniecka M et al. 2006. *Validating cancer drug targets.* Nature. 441:451-456.

Birt D F, Hendrich S, Wang W. 2001. *Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids.* Pharmacol Ther. 90:157-177.

Block M L, Hong J S. 2005. *Microglia and inflammation-mediated neuro-degeneration: multiple triggers with a common mechanism.* Prog Neurobiol. 76:77-98.



Blondel B, Autret A, Martin-Latil S, Mousson L, Pelletier I, Couderc T, Colbère-Garapin F. 2006. *Poliovirus et apoptose*. Virologie. 10:7-20.

Bogoyevitch M A, Kobe B. 2006. *Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases*. Microbiol Mol Biol Rev. 70:1061-1095.

Bondar V M, Sweeney-Gotsch B, Andreeff M, Mills G B, McConkey D J. 2002. Inhibition of the phosphatidylinositol 3'-kinase-AKT pathway induces apoptosis in pancreatic carcinoma cells in vitro and in vivo. Mol Cancer Ther. 1:989-997.

Bulavin D V, Fornace A J. 2004. *p38 MAP kinase's emerging role as a tumor suppressor*. Adv Cancer Res. 92: 95-118.

Bulavin D V, Higashimoto Y, Popoff, I J, Gaarde W A, Basrur V, Potapova O, Appella E, Fornace A J. 2001. *Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase*. Nature. 411:102-107.

Burikhanov R, Shrestha-Bhattarai T, Qiu S, Shukla N, Hebbar N, Lele S M, Horbinski C, Rangnekar VM. 2013. *Novel mechanism of apoptosis resistance in cancer mediated by extracellular PAR-4*. Cancer Res. 73:1011-1019.

Calder P C. 2002. *Dietary modification of inflammation with lipids*. Proc Nutr Soc. 61:345-358.

Cantley L C. 2002. *The phosphoinositide 3-kinase pathway*. Science. 296:1655-1657.

Cantley L C, Neel B G. 1999. *New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A. 96:4240-4245.

Carnero A, Blanco-Aparicio C, Renner O, Link W, Leal J F. 2008. *The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications*. Curr Cancer Drug Targets. 8:187-198.

Chang J E, Khuntia D, Robins H I, Mehta M P. 2007. *Radiotherapy and radiosensitizers in the treatment of glioblastoma multiforme*. Clin Adv Hematol Oncol. 5:894-902, 907-815.

Chang Q, Chen J, Beezhold K J, Castranova V, Shi X, Chen F. 2009. *JNK1 activation predicts the prognostic outcome of the human hepatocellular carcinoma*. Mol Cancer. 8:64.

Chang Q, Zhang Y, Beezhold K J, Bhatia D, Zhao H, Chen J, et al. 2009. *Sustained JNK1 activation is associated with altered histone H3 methylations in human liver cancer*. J Hepatol. 50:323-333.

Chen C C, Sun Y T, Chen J J, Chang Y J. 2001. *Tumor necrosis factor- $\alpha$  induced cyclooxygenase-2 expression via sequential activation of ceramide-dependent mitogen-activated protein kinases, and I $\kappa$ B kinase 1/2 in human alveolar epithelial cells*. Mol Pharmacol. 59:493-500.



Chen H Q, Jin Z Y, Wang X J, Xu X M, Deng L, Zhao J W. 2008. *Luteolin protects dopaminergic neurons from inflammation-induced injury through inhibition of microglial activation*. *Neurosci Lett*. 448:175-179.

Chen T, Li L P, Lu X Y, Jiang H D, Zeng S. 2007. *Absorption and excretion of luteolin and apigenin in rats after oral administration of Chrysanthemum morifolium extract*. *J Agric Food Chem*. 55:273-277.

Cheng A C, Huang T C, Lai C S, Pan M H. 2005. *Induction of apoptosis by luteolin through cleavage of Bcl-2 family in human leukemia HL-60 cells*. *Eur J Pharmacol*. 509:1-10.

Cheng W Y, Chiao M T, Liang Y J, Yang Y C, Shen C C, Yang C Y. 2013. *Luteolin inhibits migration of human glioblastoma U-87 MG and T98G cells through downregulation of Cdc42 expression and PI3K/AKT activity*. *Mol Biol Rep*. 40:5315-5326.

Chun K S, Surh Y J. 2004. *Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention*. *Biochem Pharmacol*. 68:1089-1100.

Clasadonte J, Sharif A, Baroncini M, Prevot V. 2011. *Gliotransmission by prostaglandin E<sub>2</sub>: a prerequisite for GnRH neuronal function?* *Front Endocrinol*. 2:91-110.

Cobb M H, Goldsmith E J. 1995. *How MAP Kinases Are Regulated*. *J Biol Chem*. 270:14843-14846.

Comalada M, Ballester I, Bailon E, Sierra S, Xaus J, Galvez J, de Medina F S, Zarzuelo A. 2006. *Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure-activity relationship*. *Biochem Pharmacol*. 72:1010-1021.

Conquer J A, Maiani G, Azzini E. 1998. *Supplementation with Quercetin markedly increases plasma Quercetin concentration without effect on selected risk factors for heart disease in healthy subjects*. *Fundam Appl Toxicol*. 128:593-597.

Copeland N G, Silan C M, Kingsley D M, Jenkins N A, Cannizzaro L A, Croce C M, Huebner K, Sims J E. 1991. *Chromosomal location of murine and human IL-1 receptor genes*. *Genomics*. 9:44-50.

Coulthard L R, White D E, Jones D L, McDermott M F, Burchill S A. 2009. *p38(MAPK): stress responses from molecular mechanisms to therapeutics*. *Trends Mol Med*. 15:369-379.

Coussens L M, Werb Z. 2002. *Inflammation and cancer*. *Nature*. 420 :19-26.

Dajas F, Andres A C, Florencia A, Carolina E, Felicia R M. 2013. *Neuroprotective actions of flavones and flavonols: mechanisms and relationship to flavonoid structural features*. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*. 13:30-35.

Dannenberg A J, Altorki N K, Boyle J O, Dang C, Howe L R, Weksler B B, et al. 2001.

*Cyclo-oxygenase 2: A pharmacological target for the prevention of cancer.* Lanc Oncol. 2:544-551.

Davies H, Bignell G R, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S et al. 2002. *Mutations of the BRAF gene in human cancer.* Nature. 417:949-954.

Davis R J. 1999. *Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase.* Biochem Soc Symp. 64:1-12.

Davis R J. 2000. *Signal transduction by the JNK group of MAP kinases.* Cell. 103:239-252.

De Boer V C, Dihal A A, van der Woude H, Arts I C, Wolffram S, Alink G M, Rietjens I M, Keijer J, Hollman P C. 2005. *Tissue distribution of quercetin in rats and pigs.* J Nutr. 135:1718-1725.

Dempke W, Rie C, Grothey A, Schmoll H J. 2001. *Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemother-apy?* J Cancer Res Clin Oncol. 127:411-417.

Demuth T, Reavie L B, Rennert J L, Nakada M, Nakada S, Hoelzinger D B, Beaudry C E, Henrichs A N, Anderson EM, Berens M E. 2007. *MAP-ing glioma invasion: mitogen-activated protein kinase kinase 3 and p38 drive glioma invasion and progression and predict patient survival.* Mol Cancer Ther. 6:1212-1222.

Derijard B, Hibi M, Wu I H, Barrett T, Su B, Deng T, et al. 1994. *JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain.* Cell. 76:1025-1037.

Dinareello C A. 1994. *The interleukin-1 family: 10 years of discovery.* FASEB J. 8:1314-1325.

Dirscherl K, Karlstetter M, Ebert S, Kraus D, Hlawatsch J, Walczak Y, Moehle C, Fuchshofer R, Langmann T. 2010. *Luteolin triggers global changes in the microglial transcriptome leading to a unique anti-inflammatory and neuroprotective phenotype.* J Neuroinflamm. 7:1186.

DuBois R N, Awad J, Morrow J, Roberts L J, Bishop P R. 1994. *Regulation of eicosanoid production and mitogenesis in rat intestinal epithelial cells by transforming growth factor-alpha and phorbol ester.* J Clin Invest. 93:493-498.

Durbin A D, Hannigan G E, Malkin D. 2009. *Oncogenic ILK, tumor suppression and all that JNK.* Cell Cycle. 8:4060-4066.

Durbin A D, Somers G R, Forrester M, Pienkowska M, Hannigan G E, Malkin D. 2009. *JNK1 determines the oncogenic or tumor-suppressive activity of the integrin-linked kinase in human rhabdomyosarcoma.* J Clin Invest. 119:1558-1570.

Elmore S. 2007. *Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death.* Toxicol Pathol. 35:495-516.

Ekert P G, Vaux D L. 1997. *Apoptosis and the immune system.* Br Med Bull. 53:591-603.

Eramo A, Ricci-Vitiani L, Zeuner A, Pallini R, Lotti F, Sette G, Pilozi E, Larocca L M, Peschle C, De Maria R. 2006. *Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells*. Cell Death Differ. 13:1238-1241.

Fang J, Zhou Q, Shi X L, Jiang B H. 2007. *Luteolin inhibits insulin-like growth factor 1 receptor signaling in prostate cancer cells*. Carcinogenesis. 28:713-723.

Farrow B, Evers B M. 2002. *Inflammation and the development of pancreatic cancer*. Surg Oncol. 10:153-169.

Fukuda S, Pelus L M. 2006. *Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues*. Mol Cancer Ther. 5:1087-1098.

Gabay C, Lamacchia C, Palmer G. 2010. *IL-1 pathways in inflammation and human diseases*. Nat Rev Rheumatol. 6:232-241.

Gates M A, Tworoger S S, Hecht J L, De Vivo I, Rosner B, Hankinson S E. 2007. *A prospective study of dietary flavonoid intake and incidence of epithelial ovarian cancer*. Int J Cancer. 121:2225-2232.

Ghosh N, Chaki R, Mandal V, Mandal S C. 2010. *COX-2 as a target for cancer chemotherapy*. Pharma Rep. 62:233-244.

Gingras D, Béliveau R. 2011. *Colorectal cancer prevention through dietary and lifestyle modifications*. Cancer Microenv. 4:133-139.

Giugliano D, Ceriello A, Esposito K. 2006. *The effects of diet on inflammation: emphasis on the metabolic syndrome*. J Am Coll Cardiol. 48:677-685.

Green D R. 2000. *Apoptosis and sphingomyelin hydrolysis. The flip side*. J Cell Biol. 150:F5-7.

Gupta C S, Kim J H, Prasad S, Aggarwal B B. 2010. *Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals*. Cancer Metastasis Rev. 29:405-434.

Gupta C S, Sundaram C, Aggarwal B B. 2010. *Inhibiting NF- $\kappa$ B Activation by Small Molecules As a Therapeutic Strategy*. Biochem Biophys Acta. 10:775-787.

Hanada T, Yoshimura A. 2002. *Regulation of cytokine signaling and inflammation*. Cytokine Growth Factor Rev. 13:413-421.

Hanahan D, Weinberg R A. 2000. *The hallmarks of cancer*. Cell. 100:57-70.

Hara S, Miyata A, Yokoyama C, Inoue H, Brugger R, Lottspeich F, et al. 1994. *Isolation and molecular cloning of prostacyclin synthase from bovine endothelial cells*. J Biol Chem. 269:19897-19903.

- Harborne J B, Williams C A. 2000. *Advances in flavonoid research since 1992*. Phytochem. 55:481-504.
- Hayden M S, Ghosh S. 2004. *Signaling to NF- $\kappa$ B*. Genes & Dev. 18:2195-2224.
- Heidland A, Klassen A, Rutkowski P, Bahner U. 2006. *The contribution of Rudolf Virchow to the concept of inflammation: what is still of importance?* J Nephrol. 10:102-109.
- Henson P M, Bratton D L, Fadok V A. 2001. *Apoptotic cell removal*. Curr Biol. 11:R795-R805.
- Hong T, Grabel L B. 2006. *Migration of F9 parietal endoderm cells is regulated by the ERK pathway*. J Cell Biochem. 97:1339-1349.
- Hu S, Snipas S J, Vincenz C, Salvesen G, Dixit V M. 1998. *Caspase-14 is a novel developmentally regulated protease*. J Biol Chem. 273:29648-29653.
- Huang C, Huang Y, Li J, Hu W, Aziz R, Tang M S, Sun N, Cassady J, Stoner G D. 2002. *Inhibition of benzo(a)pyrene diol-epoxide-induced transactivation of activated protein 1 and nuclear factor kappaB by black raspberry extracts*. Cancer Res. 62:6857-6863.
- Huang Y T, Hwang J J, Lee P P, Ke F C, Huang J H, Huang C J, Kandaswami C, Middleton E Jr, Lee M T. 1999. *Effects of luteolin and quercetin, inhibitors of tyrosine kinase, on cell growth and metastasis-associated properties in A431 cells overexpressing epidermal growth factor receptor*. Br J Pharmacol. 128:999-1010.
- Hui L, Zatloukal K, Scheuch H, Stepniak E, Wagner E F. 2008. *Proliferation of human HCC cells and chemically induced mouse liver cancers requires JNK1-dependent p21 downregulation*. J Clin Invest. 8:3943-3953.
- Jemal A, Bray F, Center M M, Ferlay J, Ward E, Forman D. 2011. *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin. 61:69-90.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun M J. 2007. *Cancer statistics*. CA Cancer J Clin. 57:43-66.
- Jiang H, Gautam S C, Jiang F, Pu F, Chopp M. 2010. *Dietary Polyphenols as Preventive and Therapeutic Agents in Glioblastoma*. Spring Science + Business Media. 325-339.
- Johansson N, Ala-aho R, Uitto V, Grenman R, Fusenig N E, Lopez-Otin C, Kahari V M. 2000. *Expression of collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) by transformed keratinocytes is dependent on the activity of p38 mitogen-activated protein kinase*. J Cell Sci. 113:227-235.
- Joki T, Heese O, Nikas D C, Bello L, Zhang J, Kraeft S K, Seyfried N T, Abe T, Chen L B, Carroll R S, Black P M. 2000. *Expression of cyclooxygenase 2 (COX-2) in human glioma and in vitro inhibition by a specific COX-2 inhibitor, NS-398*. Cancer Res. 60:4926-4931.



- Jolly C, Morimoto R I. 2000. *Role of the heavy shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death*. J Natl Cancer Inst. 92:1564-1572.
- Ju W, Wang X, Shi H, Chen W, Belinsky S A, Lin Y. 2007. *A critical role of luteolin-induced reactive oxygen species in blockage of tumor necrosis factor-activated nuclear factor-kappaB pathway and sensitization of apoptosis in lung cancer cells*. Mol Pharmacol. 71:1381-1388.
- Junttila M R, Ala-Aho R, Jokilehto T, Peltonen J, Kallajoki M, Grenman R, Jaakkola P, Westermarck J, Kahari V M. 2007. *p38alpha and p38delta mitogen-activated protein kinase isoforms regulate invasion and growth of head and neck squamous carcinoma cells*. Oncogene. 26:5267-5279.
- Junttila M R, Li S P, Westermarck J. 2008. *Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival*. FASEB J. 22:954-965.
- Juratli TA, Schackert G, Krex D. 20013. *Current status of local therapy in malignant gliomas - A clinical review of three selected approaches*. Pharmacol Ther. 139:341-358.
- Kanarek N, Ben-Neriah Y. 2012. *Regulation of NF- $\kappa$ B by ubiquitination and degradation of the I $\kappa$ Bs*. Immunol Rev. 246:77-94.
- Kanazawa K, Uehara M, Yanagitani H, Hashimoto T. 2006. *Bioavailable flavonoids to suppress the formation of 8-OHdG in HepG2 cells*. Arch Biochem Biophys. 455:197-203.
- Karin M. 1995. *The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases*. J Biol Chem. 270:16483-16486.
- Karin M. 2004. *Mitogen activated protein kinases as targets for development of novel anti-inflammatory drugs*. Ann Rheum Dis. 63:ii62-ii64.
- Kasibhatla S, Tseng B. 2003. *Why Target Apoptosis in Cancer Treatment?* AACR. 2:573-580.
- Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Yano M. 1999. *Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines*. Biosci Biotechnol Biochem. 63:896-899.
- Keibel A, Singh V, Sharma M C. 2009. *Inflammation, Microenvironment, and the Immune System in Cancer Progression*. Curr Pharm Des. 15:1949-1955.
- Kerr J F, Winterford C M, Harmon B V. 1994. *Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy*. Cancer. 73:2013-2026.
- Kett D H, Quartin A A, Sprung C L, Fisher C J Jr, Peña M A, Heard S O, Zimmerman J L, Albertson T E, Panacek E A, Eidelman L A, et al. 1994. *An evaluation of the hemodynamic effects of HA-1A human monoclonal antibody*. Crit Care Med. 22:1227-1234.

Kim J E, Son J E, Jang Y J, Lee D E, Kang N J, Jung S K, Heo Y S, Lee K W, Lee H J. 2011. *Luteolin, a novel natural inhibitor of tumor progression locus 2 serine/threonine kinase, inhibits tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced cyclooxygenase-2 expression in JB6 mouse epidermis cells.* J Pharmacol Exp Ther. 338:1013-1022.

Kim J S, Jobin C. 2005. *The flavonoid luteolin prevents lipopolysaccharide-induced NF- $\kappa$ B signalling and gene expression by blocking I $\kappa$ B kinase activity in intestinal epithelial cells and bone-marrow derived dendritic cells.* Immunol. 115:375-387.

Kim S Y, Ahn B H, Min K J, Lee Y H, Joe E H, Min D S. 2004. *Phospholipase D isozymes mediate epigallocatechin gallate-induced cyclooxygenase-2 expression in astrocyte cells.* J Biol Chem. 279:38125-38133.

Knekt P, Jarvinen R, Seppanen R, Hellewaara M, Teppo L, Pukkala E, Aromaa A. 1997. *Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms.* Am J Epidemiol. 146:223-230.

Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry T J, Kirschner M W, Kohts K, Kwiatkowski D J, Williams L T. 1997. *Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis.* Science. 278:294-298.

Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. 1998. *The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis.* Annu Rev Physiol. 60:619-642.

Kumazawa Y, Kawaguchi K, Takimoto H. 2006. *Immunomodulating effects of flavonoids on acute and chronic inflammatory responses caused by tumor necrosis factor  $\alpha$ .* Curr Pharm Des. 12:4271-4279.

Kuwamoto S, Inoue H, Tone Y, Izumi Y, Tanabe T. 1997. *Inverse gene expression of prostacycline and thromboxane synthases in resident and activated peritoneal macrophage.* FEBS Let. 409:242-246.

Kuwano K, Hara N. 2000. *Signal transduction pathways of apoptosis and inflammation induced by the tumor necrosis factor receptor family.* Am J Respir Cell Mol Biol. 22:147-149.

Larsson S C, Kumlin M, Ingelman-Sundberg M, Wolk A. 2004. *Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms.* Am J Clin Nutr. 79:935-945.

Lee H J, Wang C J, Kuo H C, Chou F P, Jean L F, Tseng T H. 2005. *Induction apoptosis of luteolin in human hepatoma HepG2 cells involving mitochondria translocation of Bax/Bak and activation of JNK.* Toxicol Appl Pharma. 203:124-131.

Lee-Hilz Y Y, ter Borg S, van Berkel W J, Rietjens I M, Aarts J M. 2008. *Shifted concentration dependency of EpRE- and XRE-mediated gene expression points at monofunctional EpRE-mediated induction by flavonoids at physiologically relevant concentrations.* Toxicol In Vitro. 22:921-926.

Lee L T, Huang Y T, Hwang J J, Lee P P, Ke F C, Nair M P, Kanadaswam C, Lee M T. 2002. *Blockade of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity by*

- quercetin and luteolin leads to growth inhibition and apoptosis of pancreatic tumor cells.* Anticancer Res. 22:1615-1627.
- Lefranc F, Brotchi J, Kiss R. 2005. *Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis.* J Clin Oncol. 23:2411-2422.
- Lewis A M, Varghese S, Xu H, Alexander H R. 2006. *Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment.* J Transl Med. 4:48.
- Li J, Lee A S. 2006. *Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer.* Curr Mol Med. 6:45-54.
- Li Q, Verma I M. 2002. *NF- $\kappa$ B regulation in the immune system.* Nat Rev Immunol. 2:725-734.
- Li Z, Li Z. 2012. *Glucose regulated protein 78: a critical link between tumor microenvironment and cancer hallmarks.* Biochem Biophys Acta. 1826:13-22.
- Lin C W, Shen S C, Chien C C, Yang L Y, Shia L T, Chen Y C. 2010. *12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced invasion/migration of glioblastoma cells through activating PKC $\alpha$ /ERK/NF- $\kappa$ B-dependent MMP-9 expression.* J Cell Physiol. 225:472-481.
- Lin Y, Shi R, Wang X, Shen H M. 2008. *Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy.* Curr Cancer Drug Targets. 8:634-646.
- Liu J, Lin A. 2005. *Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword.* Cell Res. 15:36-42.
- Liu J P. 1999. *Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity.* FASEB J. 13:2091-2104.
- Liu W, Reinmuth N, Stoeltzing O, Parikh A A, Tellez C, Williams S, Jung Y D, Fan F, Takeda A, Akagi M, et al. 2003. *Cyclooxygenase-2 is up-regulated by interleukin-1 beta in human colorectal cancer cells via multiple signaling pathways.* Cancer Res. 63:3632-3636.
- Lowe S W, Lin A W. 2000. *Apoptosis in cancer.* Carcinogenesis. 21: 485-495.
- Lu T, Tian L, Han Y, Vogelbaum M, Stark GR. 2007. *Dose-dependent cross-talk between the transforming growth factor-beta and interleukin-1 signaling pathways.* Proc Natl Acad Sci U S A. 104:4365-4370.
- Luo J, Manning B D, Cantley L C. 2003. *Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: Rationale and promise.* Cancer Cell. 4:257-262.
- Luqman S, Pezzuto J M. 2010. *NF $\kappa$ B: A Promising Target for Natural Products in Cancer Chemoprevention .* Phytother Res. 24: 949-963.

- Maier J A, Hla T, Maciag T. 1990. *Cyclooxygenase is an immediateearly gene induced by interleukin-1 in human endothelial cells*. J Biol Chem. 265:10805-10808.
- Malaplate-Armand C, Gueguen Y, Bertrand P, Ferrari L, Batt A M. 2000. *U373-MG response to interleukin-1beta-induced oxidative stress*. Cell Biol Toxicol. 16:155-163.
- Manju V, Nalini N. 2007. *Protective role of luteolin in 1,2-dimethylhydrazine induced experimental colon carcinogenesis*. Cell Biochem Funct. 25:189-194.
- Marszałek A, Szyłberg L, Wiśniewska E, Janiczek M. 2012. *Impact of COX-2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 and IL-10 on the process of carcinogenesis in the large bowel*. Pol J Pathol. 63:221-227.
- Mittelstadt P R, Salvador J M, Fornace A J Jr, Ashwell J D. 2005. *Activating p38 MAPK: new tricks for an old kinase*. Cell Cycle. 9:1189-1192.
- Nadjar A, Combe C, Laye S, Tridon V, Dantzer R, Amedee T, Parnet P. 2003. *Nuclear factor kappaB nuclear translocation as a crucial marker of brain response to interleukin-1. A study in rat and interleukin-1 type I deficient mouse*. J Neurochem. 87:1024-1036.
- Nadjar A, Tridon V, May MJ, Ghosh S, Dantzer R, Amedee T, Parnet P. 2005. *NFkappaB activates in vivo the synthesis of inducible Cox-2 in the brain*. J Cereb Blood Flow Metab. 25:1047-1059.
- Nagai S, Washiyama K, Kurimoto M, Takaku A, Endo S, Kumanishi T. 2002. *Aberrant nuclear factor-kappaB activity and its participation in the growth of human malignant astrocytoma*. J Neurosurg. 96:909-917.
- Naugler W E, Karin M. 2008. *NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms*. Curr Opin Genet Dev. 18:19-26.
- Nazari Q A, Kume T, Takada-Takatori Y, Izumi Y, Akaike A. 2013. *Protective effect of luteolin on an oxidative-stress model induced by microinjection of sodium nitroprusside in mice*. J Pharmacol Sci. 122:109-117.
- Neergheen V S, Baborun T, Taylor E W, Jen L S, Aruoma O I. 2009. *Targeting specific cell signaling transduction pathways by dietary and medicinal phytochemicals in cancer chemoprevention*. Toxicol. 278:229-241.
- Netea M G. 2009. *Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 $\beta$  in monocytes and macrophages*. Blood. 113:2324-2335.
- Neuhouser M L. 2004. *Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies*. Nutr Cancer. 50:1-7.
- Nicholson D. 1999. *Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death*. Cell Death Differ. 11:1028-1042.



- Niyazi M, Siefert A, Schwarz S B, Ganswindt U, Kreth F W, Tonn J C, Belka C. 2011. *Therapeutic options for recurrent malignant glioma*. Radiother Oncol. 98:1-14.
- Nogueira L, Ruiz-Ontanon P, Vazquez-Barquero A, Moris F, Fernandez-Luna JL. 2011. *The NF-kappaB pathway: a therapeutic target in glioblastoma*. Oncotarget. 2:646-653.
- O'Neill L A. 1995. *Interleukin-1 signal transduction*. Int J Clin Lab Res. 25:169-77.
- Ozes O N, Mayo L D, Gustin J A, Pfeffer S R, Pfeffer L M, Donner D B. 1999. *NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase*. Nature. 401:82-85.
- Paliyath G, Bakovic M, Shetty K. 2011. *Functional Foods, Nutraceuticals and Degenerative Disease Prevention*. John Wiley & Sons. 1981.
- Park J B, Kwak H J, Lee S H. 2008. *Role of hyaluronan in glioma invasion*. Cell Adh Migr. 2:202-207.
- Paulke A, Schubert-Zsilavecz M, Wurglics M. 2006. *Determination of St. John's wort flavonoid-metabolites in rat brain through high performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 832:109-113.
- Peppelenbosch M P, Tertoolen L G, Hage W J, de Laat S W. 1993. *Epidermal growth factor-induced actin remodeling is regulated by 5-lipoxygenase and cyclooxygenase products*. Cell. 74:565-575.
- Perkins N D. 2012. *The diverse and complex roles of NF-kappaB subunits in cancer*. Nat Rev Cancer. 12:121-132.
- Persad S, Attwell S, Gray V. 2001. *Regulation of protein kinase B/Akt- serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: Critical roles kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343*. J Biol Chem. 276: 27462-27469.
- Pettit G R, Hoard M S, Doubek D L, Schmidt J M, Pettit R K, Tackett L P, Chapuis J Ch. 1996. *The cancer cell growth inhibitory constituents of Terminalia arjuna (Combretaceae)*. J. Ethnopharmacol. 53:57-63.
- Peyssonnaud C, Eychène A. 2001. *The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation*. Biol Cell. 93:53-62.
- Platz E A, Willett W C, Colditz G A, et al. 2000. *Proportion of colon cancer risk that might be preventable in a cohort of middle-aged US men*. Cancer Causes Control. 11:579-588.
- Pratheeshkumar P, Son Y O, Budhreja A, Wang X, Ding S, Wang L, Hitron A, Lee J C, Kim D, Divya S P, Chen G, Zhang Z, Luo J, Shi X. 2012. *Luteolin inhibits human prostate tumor growth by suppressing vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis*. PLoS One. 7:1-15.

Prayson R A, Castilla E A, Vogelbaum M A, Barnett G H. 2002. *Cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by immunohistochemistry in glioblastoma multiforme*. Ann Diagn Pathol. 6:148-153.

Prueitt R L, Boersma B J, Howe T M, Goodman J E, Thomas D D, Ying L, Pfiester C M, Yfantis H G, Cottrell J R, Lee D H, Remaley A T, Hofseth L J, Wink D A, Ambs S. 2007. *Inflammation and IGF-I activate the Akt pathway in breast cancer*. Int J Cancer. 120:796-805.

Quinones Q J, de Ridder G G, Pizzo S V. 2008. *GRP78: a chaperone with diverse roles beyond the endoplasmic reticulum*. Histol Histopathol. 23:1409-1416.

Radotra B, McCormick D. 1997. *Glioma invasion in vitro is mediated by CD44-hyaluronan interactions*. J Pathol. 181:434-438.

Raman M, Chen W, Cobb M H. 2007. *Differential regulation and properties of MAPKs*. Oncogene. 26:3100-3112.

Régina A, Demeule M, Ché C, Lavallée I, Poirier J, Gabathuler R, Béliveau R, Castaigne J P. 2008. *Antitumour activity of ANG1005, a conjugate between paclitaxel and the new brain delivery vector Angiopep-2*. Br J Pharmacol. 155:185-197.

Rezai-Zadeh K, Ehrhart J, Bai Y, Sanberg P R, Bickford P, Tan J, Shytle R D. 2008. *Apigenin and luteolin modulate microglial activation via inhibition of STAT1-induced CD40 expression*. J Neuroinflam. 5:41.

Ricciotti E, FitzGerald G A. 2011. *Prostaglandins and inflammation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 31:986-1000.

Roberts P, Der C. 2007. *Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer*. Oncogene. 26:3291-3310.

Rodrigues S, Bruyneel E, Rodrigue C M, Shahin E, Gespach C. 2004. *Cyclooxygenase 2 and carcinogenesis*. Bull Cancer. 91:S61-S76.

Romashkova J A, Makarov S S. 1999. *NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling*. Nature. 401:86-90.

Ross J A, Kasum C M. 2002. *Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety*. Annu Rev Nutr. 22:19-34.

Rothwell N J, Luheshi G N. 2000. *Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target*. Trends Neurosci. 23:618-625.

Ruiz P A, Haller, D. 2006. *Functional diversity of flavonoids in the inhibition of the proinflammatory NF-kappaB, IRF, and Akt signaling pathways in murine intestinal epithelial cells*. J Nutr. 136:664-671.

Saccani S, Pantano S, Natoli G. 2003. *Modulation of NF-kappaB activity by exchange of dimers*. Mol Cell. 6:1563-1574.

Saijo Y, Tanaka M, Miki M, Usui K, Suzuki T, Maemondo M, Hong X, Tazawa R, Kikuchi T, Matsushima K, et al. 2002. *Proinflammatory cytokine IL-1 beta promotes tumor growth of Lewis lung carcinoma by induction of angiogenic factors: in vivo analysis of tumor-stromal interaction*. J Immunol. 169:469-475.

Sakahira H, Enari M, Nagata S. 1998. *Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis*. Nature. 391:96-99.

Salmena L, Carracedo A, Pandolfi P P. 2008. *Tenets of PTEN Tumor Suppression*. Cell. 133:403-411.

Sawmiller D, Li S, Shahaduzzaman M, Smith A J, Obregon D, Giunta B, Borlongan C V, Sanberg P R, Tan J. 2014. *Luteolin reduces Alzheimer's disease pathologies induced by traumatic brain injury*. Int J Mol Sci. 15:895-904.

Scalbert A, Williamson G. 2000. *Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols*. J Nutr. 130:2073S-2085S.

Schreck R, Rapp U R. 2006. *Raf kinases: oncogenesis and drug discovery*. Int J Cancer. 119: 2261-2271.

Seelinger G, Merfort I, Schempp CM. 2008. *Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin*. Planta Med. 74:1667-1677.

Seelinger G, Merfort I, Wölfl U, Schempp CM. 2008. *Anti-carcinogenic effects of the flavonoid luteolin*. Molecules.13:2628-2651.

Serra A, Rubio L, Borrás X, Macià A, Romero M P, Motilva M J. 2012. *Distribution of olive oil phenolic compounds in rat tissues after administration of a phenolic extract from olive cake*. Mol Nutr Food Res. 56:486-496.

Shakur S F, Bit-Ivan E, Watkin W G, Merrell R T, Farhat H I. 2013. *Multifocal and multicentric glioblastoma with leptomeningeal gliomatosis: a case report and review of the literature*. Case Rep Med. 132679:1-10.

Sheng H, Shao J, Dixon D A, Williams C S, Prescott S M, DuBois R N, Beauchamp R D. 2000. *Transforming growth factor $\beta$ 1 enhances Ha-ras-induced expression of cyclooxygenase-2 in intestinal epithelial cells via stabilization of mRNA*. J Biol Chem. 275:6628-6635.

Sheng H, Williams C S, Shao J, Liang P, DuBois R N, Beauchamp R D. 1998. *Induction of cyclooxygenase-2 by activated Ha-ras oncogene in Rat-1 fibroblasts and the role of mitogen-activated protein kinase pathway*. J Biol Chem. 273:22120-22127.

Shi R X, Ong C N, Shen H M. 2004. *Luteolin sensitizes tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis in human tumor cells*. Oncogene. 23:7712-7721.

Shields J M, Pruitt K, McFall A, Shaub A, Der C J. 2000. *Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'. TrendsCell RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF*. Cell. 116:855-867.



Shimoi K, Okada H, Furugori M, Goda T, Takase S, Suzuki M, Hara Y, Yamamoto H, Kinae N. 1998. *Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O-beta-glucoside in rats and humans*. FEBS Lett. 438:220-224.

Shimoi K, Saka N, Nozawa R, Sato M, Amano I, Nakayama T, Kinae N. 2001. *Deglucuronidation of a flavonoid, luteolin monoglucuronide, during inflammation*. Drug Metab Dispos. 29:1521-1524.

Shinohara H, Balboa M A, Johnson C A, Balsinde J, Dennis E A. 1999. *Regulation of delayed prostaglandine production in activated P388D1 macrophages by group IV cytosolic and group V secretory phospholipase A2s*. J Biol Chem. 274:12263-12268.

Shiojima I, Walsh K. 2002. *Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis*. Circ Res. 90:1243-1250.

Sims J, Giri J G, Dower S K. 1994. *The two interleukin-1 receptors play different roles in IL-1 actions*. Clin Immunol Immunopathol. 72:9-14.

Smith W L. 1992. *Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action*. Am J Physiol. 263: F181-F191.

Sobolewski C, Cerella C, Dicato M, Ghibelli L, Diederich M. 2010. *The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies*. Int J Cell Biol. 2010:215158.

Solinas G, Marchesi F, Garlanda C, Mantovani A, Allavena P. 2010. *Inflammation-mediated promotion of invasion and metastasis*. Cancer Metastasis Rev. 29:243-248.

Spencer J P E. 2007. *The interactions of flavonoids within neuronal signalling pathways*. Genes Nutr. 2:257-273.

Steelman L S, Chappell W H, Abrams S L, Kempf R C, Long J, Laidler P, Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, et al. 2011. *Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging*. Aging. 3:192-222.

Stennicke H, Salvesen G. 2000. *Caspases: controlling intracellular signals by protease zymogen activation*. Biochem Biophys Acta. 1477:299-306.

Sun Y, Chen J, Rigas B. 2009. *Chemopreventive agents induce oxidative stress in cancer cells leading to COX-2 overexpression and COX-2-independent cell death*. Carcinogenesis. 30:93-100.

Surh Y J. 2003. *Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals*. Nat Rev Cancer. 3:768-780.

Suzuki T, Watanabe K, Kanaoka Y, Sato T, Hayaishi O. 1997. *Induction of hematopoietic prostaglandin D synthase in human megakaryocytic cells by phorbol ester*. Biochem and Biophys Research Commun. 241:288-293.



- Tahanian E, Sanchez L A, Shiao T C, Roy R, Annabi B. 2011. *Flavonoids targeting of IkappaB phosphorylation abrogates carcinogen-induced MMP-9 and COX-2 expression in human brain endothelial cells*. Drug Des Devel Ther. 5:299-309.
- Taniura S, Kamitani H, Watanabe T, Eling TE. 2008. *Induction of cyclooxygenase-2 expression by interleukin-1beta in human glioma cell line, U87MG*. Neurol Med Chir (Tokyo). 48:500-505; discussion 505.
- Thant A A, Nawa A, Kikkawa F, Ichigotani Y, Zhang Y, Sein T T, Amin A R, Hamaguchi M. 2000. *Fibronectin activates matrix metalloproteinase-9 secretion via the MEK1-MAPK and the PI3K-Akt pathways in ovarian cancer cells*. Clin Exp Metastasis. 18:423-428.
- Vivanco I, Sawyers C L. 2002. *The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer*. Nat Rev Cancer. 2:489-501
- Voronov E, Shouval D S, Krelm, Cagnano E, Benharroch D, Iwakura Y, Dinarello C A, Apte R N. 2003. *IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis*. PNAS. 100: 2645-2650.
- Wang L N, Yao M, Yang J P, Peng J, Peng Y, Li C F, Zhang Y B, Ji F H, Cheng H, Xu Q N, Wang X Y, Zuo J L. 2011. *Cancer-induced bone pain sequentially activates the ERK/MAPK pathway in different cell types in the rat spinal cord*. Mol Pain. 7:1-11.
- Wang M T, Honn K V, Nie D. 2007. *Cyclooxygenases, prostanoids, and tumor progression*. Cancer Metastasis Rev. 26:525-534.
- Weber A, Wasiliew P, Kracht M. 2010. *Interleukin-1 (IL-1) pathway*. Sci Signal. 3:1126.
- Weng C J, Yen G C. 2012. *Flavonoids, a ubiquitous dietary phenolic subclass, exert extensive in vitro anti-invasive and in vivo anti-metastatic activities*. Cancer Metastasis Rev. 31:323-351.
- Wang C Y, Cusack J C, Jr., Liu R, Baldwin A S, Jr. 1999. *Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB*. Nat Med. 5:412-417.
- Williams C S, Mann M, DuBois R N. 1999. *The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development*. Oncogene. 18:7908-7916.
- Wiseman M. 2008. *The second World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research expert report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective*. Proc Nutr Soc. 67:253-256.
- Wood L J, Weymann K. 2013. *Inflammation and neural signaling: etiologic mechanisms of the cancer treatment-related symptom cluster*. Curr Opin Support Palliat Care. 7:54-59.
- Wruck C J, Claussen M, Fuhrmann G, Romer L, Schulz A, Pufe T, Waetzig V, Peipp M, Herdegen T, Gotz M E. 2007. *Luteolin protects rat PC12 and C6 cells against MPP+ induced toxicity via an ERK dependent Keap1-Nrf2-ARE pathway*. J Neural Transm Suppl. 72:57-67.

Xagorari A, Papapetropoulos A, Mauromatis A, Economou M, Fotsis T, Roussos C. 2001. *Luteolin inhibits an endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages*. J Pharmacol Exp Ther. 296:181-187.

Xu K, Shu H K. 2007. *EGFR activation results in enhanced cyclooxygenase-2 expression through p38 mitogen-activated protein kinase-dependent activation of the Sp1/Sp3 transcription factors in human gliomas*. Cancer Res. 67:6121-6129.

Yamamoto Y, Gaynor R B. 2004. *IkappaB kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway*. Trends Biochem Sci. 29:72-79.

Yao J, Kim T W, Qin J, Jiang Z, Qian Y, Xiao H, Lu Y, Qian W, Gulen M F, Sizemore N, DiDonato J, Sato S, Akira S, Su B, Li X. 2007. *Interleukin-1 (IL-1)-induced TAK1-dependent Versus MEKK3-dependent NFkappaB activation pathways bifurcate at IL-1 receptor-associated kinase modification*. J Biol Chem. 282:6075-6089.

Yeung Y T, Bryce N S, Adams S, Braidy N, Konayagi M, McDonald K L, Teo C, Guillemain G J, Grewal T, Munoz L. 2012. *p38 MAPK inhibitors attenuate pro-inflammatory cytokine production and the invasiveness of human U251 glioblastoma cells*. J Neurooncol. 109:35-44.

Yoshino Y, Aoyagi M, Tamaki M, Duan L, Morimoto T, Ohno K. 2006. *Activation of p38 MAPK and/or JNK contributes to increased levels of VEGF secretion in human malignant glioma cells*. Int J Onc. 29:981-987.

Youdim K A, Qaiser M Z, Begley D J, Rice-Evans C A, Abbott N J. 2004. *Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier*. Free Radic Biol Med. 36:592-604.

Young J F, Duthie S J, Milne L, Christensen L P, Duthie G G, Bestwick C S. 2007. *Biphasic effect of falcarinol on caco-2 cell proliferation, DNA damage, and apoptosis*. J Agric Food Chem. 55:618-623.

Zhang L H, Zhang X. 2010. *Roles of GRP78 in physiology and cancer*. J Cell Biochem. 110:1299-1305.

Zhong H, May M J, Jimi E, Ghosh S. 2002. *The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1*. Mol Cell. 3:625-636.

Zhou P, Li L P, Luo S Q, Jiang H D, Zeng S. 2008. *Intestinal absorption of luteolin from peanut hull extract is more efficient than that from individual pure luteolin*. J Agric Food Chem. 56:296-300.

Zhu Z, Zhong S, Shen Z. 2011. *Targeting the inflammatory pathways to enhance chemotherapy of cancer*. Cancer Biol Ther. 12:95-105.